



El Colegio de la Frontera Sur

Factores que influyen en la dispersión espacio-temporal de broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)

Tesis

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctora en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable
Con orientación en Ecología de Artrópodos y Manejo de plagas

Por

Ariana Karina Román Ruiz

2017



El Colegio de la Frontera Sur

Tapachula, Chiapas a 16 de junio de 2017

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de:

Ariana Karina Román Ruiz

hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada:

"Factores que influyen en la dispersión espacio-temporal de broca del café
Hypothenemus hampei (Coleoptera: Curculionidae)"

Para obtener el grado de **Doctora en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable**

Nombre

Firma

Director Dr. Juan Francisco Barrera Gaytán

Co-Director Dr. Bernard P. Dufour

Asesor Dr. Leopoldo Caridad Cruz López

Asesor Dr. Julio Cesar Rojas León

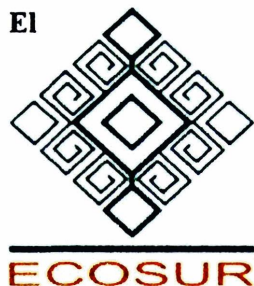
Sinodal adicional Dr. José Pablo Liedo Fernández

Sinodal adicional Dr. Jorge Toledo Arreola

Sinodal adicional Dr. Jaime Gómez Ruiz

Sinodal suplente Dra. Arianne Liliane Jeanne Dor Roques

El



Colegio de la Frontera Sur

Tapachula, Chiapas a 16 de junio de 2017

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de:

Ariana Karina Román Ruiz

hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada:

“Factores que influyen en la dispersión espacio-temporal de broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)”

Para obtener el grado de **Doctora en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable**

Nombre

Firma

Director Dr. Juan Francisco Barrera Gaytán

Co-Director Dr. Bernard P. Dufour

Asesor Dr. Leopoldo Caridad Cruz López

Asesor Dr. Julio Cesar Rojas León

Sinodal adicional Dr. José Pablo Liedo Fernández

Sinodal adicional Dr. Jorge Toledo Arreola

Sinodal adicional Dr. Jaime Gómez Ruiz

Sinodal suplente Dra. Ariane Liliane Jeanne Dor Roques

Dedicado a

mí gran amor Juan Luís, por darme fortaleza, siempre apoyarme para cumplir mis propósitos sin importar las adversidades, pero principalmente, por tu amor incondicional. ¡Te amo!

A mí pequeña princesa Natalia, eres mí gran amor y mayor motivación para ser mejor cada día ¡Te amo bebé!

A mis padres Francisco y Matilde, que son el pilar de la familia y, a mis hermanos Sandra y Francisco. Ustedes me han enseñado que la distancia no es un obstáculo para seguir unidos. Gracias por las sabias palabras en el momento adecuado, por el apoyo incondicional e incluso por la compañía durante las salidas de campo y desvelos de laboratorio.

A mis abuelitos Antonio[†], Consuelo[†], Saúl y Antonio, sus sabias palabras, anécdotas y experiencia en la vida, me han ayudado a elegir lo que quiero vivir.

¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)** y al **Institut de Recherche pour le Développement (IRD)** por la beca otorgada durante el periodo enero 2013 – abril 2016 (número de beca 777606C) y, al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada durante el periodo mayo-diciembre 2016 (número de beca 293465).

A las personas de las fincas cafetaleras “**La Alianza**” y “**La Concepción**” municipio de Cacahoatán, Chis., Méx., por permitirme la realización de la etapa experimental en sus instalaciones.

A mis tutores, el **Dr. Juan F. Barrera Gaytán**, por su valiosa tutoría, apoyo, orientación, paciencia y por haber confiado en mí para la realización de este trabajo; y, al **Dr. Bernard P. Dufour**, por su valiosa tutoría, apoyo, orientación y paciencia durante el desarrollo de este trabajo, tus consejos siempre fueron muy acertados y valiosos. Muchas gracias a los dos, los admiro como investigadores y de ustedes me llevo las mejores enseñanzas y consejos. Siempre será una excelente experiencia haber trabajado juntos.

Al **Dr. Julio C. Rojas León**, mi gran admiración y agradecimiento por su valiosa asesoría y orientación profesional antes y durante la realización de este proyecto de investigación y, al **Dr. Leopoldo C. Cruz López**, por su orientación profesional y valiosa asesoría, así como por su apoyo brindado desde el inicio de mi formación en la investigación. Gracias a ambos por motivarme a continuar en esta línea, sus enseñanzas y consejos siempre han sido enriquecedoras.

Al **Dr. Bruno Michel**, por su orientación profesional y asesoría. Gracias por tu paciencia y amistad, fue un gusto haber trabajado contigo. *À bientôt!*

A todo el personal técnico que colaboró en esta investigación, **Q. A. Enrique López Pascasio** por su apoyo técnico durante la realización de esta investigación. Gracias químico por siempre acompañarme a campo, por sus consejos y paciencia, sin su colaboración este trabajo no hubiera sido el mismo; **Sergio Dorian Moreno, Lesyver de la Rosa, Jose Luis López, Dulce Thelma González y Angeles Palomeque**, por su apoyo técnico en esta investigación, su colaboración fue muy valiosa, gracias por sus consejos, anécdotas y risas, son parte importante de este logro.

Al **M. en E. Javier F. Valle Mora** por su apoyo académico, enseñanzas y paciencia. Gracias por hacer que la estadística sea más sencilla.

A **Beatriz Romero Valadez y Anahí González Peña**, por su apoyo y facilitación de los procesos administrativos y académicos del Posgrado ECOSUR.

Al personal del CIRAD e IRD, por facilitar todos los procesos relacionados con esta investigación. A la **Dra. Fabienne Ribeyre** por su valiosa asesoría y apoyo académico, así como por la paciencia y hospitalidad. A **Béatrice Rogier y Elise Montet** del CIRAD e IRD, respectivamente, por su apoyo y facilitación de los procesos administrativos y académicos. Gracias por su amabilidad, confianza y amistad. Merci beaucoup pour tout!. A **Sandrine Lerosier** del IRD, por su apoyo y facilitación en los procesos administrativos y académicos. Y, a los miembros de la línea **UR Bioagresseurs del CIRAD Baillarguet**, área de **Entomología del CBGP**, al **laboratorio ANSES de Monferrier-sur-Lez** por su amabilidad y hospitalidad.

Al **Dr. Pablo Liedo, Dr. Jorge Toledo, Dr. Jaime Ruiz y Dra. Arianne Dor** por haber accedido a conformar el comité examinador. Gracias por el esfuerzo realizado en la revisión de este documento. Su atenta lectura y atinados comentarios contribuyeron en el enriquecimiento de este trabajo.

A mis **maestros de Posgrado**, gracias por sus enseñanzas y motivación por la ciencia.

A **Ana María Galindo Rodas** y **Margarita Inés Hernández** de biblioteca, por su valiosa colaboración en la búsqueda de documentos y referencias bibliográficas; a **Carmina Méndez Santoyo** de contabilidad y a **Rosario Velasco** de recepción por su apoyo en los trámites administrativos. Con su ayuda, los trámites siempre fueron rápidos y oportunos. Gracias por brindarme su amistad sincera y confianza.

A **Fabiola Roque** y **Alberto Meneses** de divulgación, y al **personal administrativo** por su colaboración y facilitación de trámites administrativos.

A mis compañeros de generación y amigos, **Lupita García Coapio**, **Edwin Ramírez Santos**, **Yadira Siu**, **José Luis Quintero**, **Miriam Peña**, **Alfredo González**, **Frander Riveron** y **Rosby Ornelas**, por las charlas amenas y buenos momentos que pasamos juntos. Gracias por su apoyo, confianza y amistad.

A mis amigos más cercanos, **Angeles Palomeque**, **Brenda Morán**, **Dulce Thelma González**, **Felipe Bosa**, **Marco Chayes**, por el apoyo incondicional y paciencia. Gracias por brindarme su amistad sincera.

Gracias a todas aquellas personas que estuvieron involucradas en el desarrollo de este trabajo y que por la premura se me olvidaron mencionar.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. Introducción	2
1.1. El café y la broca	4
1.2. Biología y ecología de la broca del café	5
1.2.1 Factores que influyen en la emergencia	6
1.3. Dispersión	7
1.3.1 Situación de la dispersión de <i>H. hampei</i>	7
1.3.2 Técnicas de estudio	9
CAPÍTULO 2. Desarrollo de técnicas	
2.1. Identificación de los espermatozoides y espermateca de <i>H. hampei</i>	11
2.2. Inducción de la emergencia, despegue y vuelo de hembras Colonizadoras de <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae)	31
CAPÍTULO 3. Dispersión temporal y sobrevivencia de <i>H. hampei</i>	
3.1. Actividad estacional de vuelo y estado de apareamiento de hembras colonizadoras de <i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae) durante el periodo inter cosecha en el sureste de México	40
3.2. Efecto de los sustratos alternos como refugios temporales y humedad en la sobrevivencia de <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)	60
CAPÍTULO 4. Dispersión espacial de <i>H. hampei</i>	
4.1 Dispersión a larga distancia de <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) durante el periodo inter cosecha	83
4.2. Dispersión a corta distancia de <i>H. hampei</i>	105
CAPÍTULO 5. Discusión y Conclusiones	
5.1. Discusión	126

5.2. Conclusiones

132

Literatura citada

134

RESUMEN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es la plaga más importante del café, *Coffea* spp., en el mundo. Este insecto ha sido motivo de numerosos estudios, sin embargo, muchos aspectos de su dispersión se desconocen o requieren ser determinados. La presente investigación tuvo el objetivo de estudiar los factores que influyen en la dispersión espacio-temporal de la broca del café. Dado que la dispersión es un proceso complejo, para ser estudiada se desarrollaron técnicas para la obtención del material biológico con condiciones adecuadas para el estudio, para facilitar el estudio de la morfología del complejo espermático de *H. hampei* y de marcaje-liberación-recaptura para estudiar la capacidad de vuelo y los factores que la afectan. Los resultados más sobresalientes indican que la espermateca de *H. hampei* está ubicada en la parte final del abdomen entre la glándula accesoria y el oviducto común y está compuesta por un ducto espermático, músculos espermáticos y una glándula espermática; además, posee músculos al final de su curvatura extrema y su cutícula está finamente reticulada. Los espermatozoides se observaron como filamentos minúsculos, endeble y homogéneos, congregados longitudinalmente dentro de la espermateca. La emergencia masiva de las CH se relacionó con las lluvias y se presentó entre febrero y junio, que corresponde al periodo intercosecha. Todas las CH examinadas tenían espermatozoides en la espermateca, lo que sugiere que se habían apareado antes de abandonar el fruto natal. La sobrevivencia de las hembras colonizadoras fue mayor en ambientes húmedos y en sustratos diferentes a su hospedero. Durante el periodo de fructificación del café, las hembras se dispersaron mediante vuelo a los glomérulos de frutos adyacentes. Después de colonizar un fruto, la CH perdió su capacidad de vuelo de forma gradual en el transcurso de 5 a 6 días; durante este tiempo, las hembras evaluadas realizaron más de un vuelo. Algunas CH marcadas y liberadas se recapturaron a 75 m de distancia del sitio de liberación a las 24 h después de haber sido liberadas. Finalmente, se discute la importancia de los hallazgos de la dispersión espacio-temporal de la broca del café, como información clave para mejorar la comprensión del complejo café-broca, y el manejo de la broca.

Palabras clave: inseminación, corta distancia, marcaje-liberación-captura, sobrevivencia, vuelo.

CAPÍTULO 1

Introducción

Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), conocida como la broca del café, es una plaga que ataca a los frutos de *Coffea* spp. (Le Pelley 1973). Las hembras dañan directamente a los frutos para alimentarse e indirectamente por la oviposición, alimentación y emergencia de su progenie, lo que genera importantes pérdidas económicas (Damon 2000).

En el campo, se puede observar que los frutos infestados por la broca exhiben un patrón agregado, lo que significa que la presencia de un fruto infestado incrementa la probabilidad de infestación de frutos aledaños, dando lugar a focos o parches de infestación (Barrera et al. 2005). Generalmente, las primeras lluvias después de la cosecha del café, favorece la emergencia masiva de hembras de *H. hampei* y su dispersión hacia nuevos sitios de colonización (Barrera et al. 2005, 2006). Así, cuando incrementa la disponibilidad del hospedero, la probabilidad de incrementar la población de broca es mayor (Barrera et al. 2006). En consecuencia, mayores áreas de cultivo son infestadas y dañadas por esta plaga, lo que reduce la producción y genera cuantiosas pérdidas económicas en la cafeticultura.

La dispersión es el medio que permite a los insectos herbívoros de desplazarse y localizar a su hospedero donde se desarrolla y perpetua (Kim y Sappintong 2013). La capacidad de dispersión del insecto y, las condiciones ambientales y bióticas son factores que influyen en la localización de su hospedero viable (Nathan et al. 2003, Schowalter 2006). Se sabe que, en los agroecosistemas, la dispersión de los insectos puede realizarse mediante vuelos cortos en la vecindad del sitio de desarrollo o hacia hospederos vecinos, o vuelos largos en busca de poblaciones distantes de hospederos (Johnson 1970, Pearson 2002). En el caso de la broca, se sugiere que durante el periodo de fructificación del café, las hembras colonizadoras se dispersan en la periferia del sitio de emergencia, en tanto que en el periodo intercosecha éstas tienden a dispersarse a largas distancias (Barrera et al. 2005, 2006). Sin embargo, existe poca evidencia experimental que confirme estos patrones de dispersión espacial y temporal. La falta de conocimiento sobre el comportamiento del insecto, la complejidad del problema que

representa el estudio de un insecto críptico, y las dificultades metodológicas para estudiar la dispersión en laboratorio y campo, son factores que han dificultado la obtención de información indispensable para comprender este proceso, manejar con mayor eficacia a la broca y reducir las pérdidas ocasionados por la plaga.

Para estudiar la dispersión de los insectos se requiere conocer el estado fisiológico de las hembras aptas a colonizar y por consiguiente, la morfología del aparato reproductor y de los músculos alares sobre su capacidad de dispersión (Johnson 1970). Asimismo, es necesario desarrollar e implementar técnicas directas como el marcaje-liberación-captura e indirectos como el trapeo, la dispersión espacial y experimentos de vuelo en laboratorio (Kim y Shappington 2013). Tomando como referencia estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el estado fisiológico del insecto y la influencia de factores ambientales sobre la dispersión de las hembras colonizadoras de la broca del café. Primero, se identificaron las características que exhiben las hembras adultas antes y durante su dispersión, para lo cual se realizaron técnicas de tinción que describen la morfología del complejo espermático y los espermatozoides contenidos en la espermateca, y en consecuencia, se determinó el porcentaje de hembras inseminadas durante los periodos de intercosecha y fructificación del café; se determinó la capacidad de vuelo estacional, así como de sobrevivir en ambientes secos y húmedos, y en sustratos alternos durante la ausencia de frutos de café viables, y si las hembras de broca del café pueden realizar más de un vuelo después de su emergencia a partir de frutos residuales, y con ello, se caracterizó el proceso de dispersión espacial de las hembras colonizadoras durante el periodo intercosecha y fructificación del café.

Este trabajo de investigación está organizado en cinco capítulos. En el primer capítulo, se hace una revisión de literatura para presentar el estado del conocimiento sobre la broca, los factores que influyen sobre su emergencia y dispersión así como las técnicas para estudiar la dispersión espacio-temporal de los insectos con énfasis en *H. hampei*. El segundo capítulo esta dedicado a la descripción morfológica del complejo espermático, espermatozoides y reconocimiento de espermatecas inseminadas o vírgenes, y a la optimización de la inducción de emergencia, despegue y vuelo de *H. hampei*. En el tercer capítulo se analizaron los porcentajes de hembras inseminadas durante el periodo intercosecha y fructificación del café, así como la influencia de la lluvia

y viento sobre su dispersión, así como la capacidad de sobrevivir en ambientes secos y húmedos, y en sustratos diferentes a su hospedero. El cuarto capítulo aborda el desarrollo del marcaje cuticular de las hembras colonizadoras de *H. hampei* y la implementación del marcaje-liberación-captura en el estudio de la dispersión a larga distancia, así como el estudio de dispersión a corta distancia. Finalmente, en el quinto capítulo se discuten los resultados más relevantes y se describe la conclusión del trabajo de investigación.

1.1. El café y la broca

El café es un arbusto originario de África, que pertenece al género *Coffea* conformado por 123 especies, entre las cuales *C. arabica* L. y *C. canephora* Pierre ex A. Froehner son las dos especies cultivadas con carácter comercial (Vega et al. 2015). Con la introducción del cultivo a otras regiones y con transcurso del tiempo, la producción y consumo del café se incrementó a nivel mundial. Las semillas son tostadas y molidas para elaborar una de las bebidas más consumidas en el mundo, solo después del agua y del té (Topik 2004). Las plantas de *C. arabica* (café arábica) cultivadas en terrenos entre 900-2000 msnm producen un café fino y aromático. Mientras que, las plantas de *C. canephora* (café robusta) se cultivan en terrenos que van desde el nivel del mar hasta los 800 msnm, producen una bebida ácida, fuerte y estimulante por su alto contenido de cafeína, y generalmente sus granos son usados en la fabricación de café soluble o en la elaboración de mezclas (Rojas 1987, Rojo y Pérez-Urria 2014). De acuerdo con la organización Internacional del Café, en 2014 la población mundial consumió 8958 millones de kilogramos de café (OIC 2015).

Los 13 países con mayor producción de café son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía, Honduras, India, Perú, Uganda, Guatemala, China, Nicaragua y México. A nivel mundial se estima que más de 20 millones de familias dependen de la producción de este cultivo (Vega et al. 2015, USDA-FAS 2016). En México, el 93.4% de la cosecha se concentró en los estados de Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero y Chiapas; en este último, los municipios de Chilón, Motozintla, Siltepec y Tapachula, generan la quinta parte de la producción nacional (FIRA 2016).

Entre los problemas fitosanitarios que limitan el desarrollo de la cafeticultura se encuentran las plagas, en particular, la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), que genera importantes pérdidas económicas. La broca es endémica de África, y tiene la característica de atacar y dañar a los granos (Damon 2000; Gauthier 2010). Debido a la expansión del cultivo y al comercio de café, la broca se encuentra en la mayoría de los países productores de café, a excepción de China, Madagascar y Nepal (Dufour comu. pers.), por lo que es la principal plaga de la cafeticultura en el mundo. En este sentido, Vega et al. (2015) indican que el primer reporte de este insecto se realizó en Mount Coffee, Liberia y se describió como *Stephanoderes cooki*. En 1901, la broca del café fue reportada como una plaga de *C. canephora* en Gabón (Beille 1925) y en la República del Congo (Fleutiaux 1901), en 1908 fue reportada en Indonesia (Hagedorn 1910). En 1913, *H. hampei* se reportó por primera vez en el continente americano, en Brasil, donde fue introducida accidentalmente en semillas de café procedentes de la República Democrática del Congo (Berthet 1913, Neiva et al. 1924, Neiva 1928). De ahí se diseminó a otros países del continente americano, reportándose por primera vez en 1978 en México (Baker 1984). Estudios moleculares muestran que las rutas de diseminación de la broca corresponden a tres grupos: 1) Colombia, Honduras, y México; 2) Fiji, Indonesia, Costa de Marfil, Jamaica, Nueva Caledonia, Las Filipinas, y Tailandia; y 3) Kenia. Por lo tanto, se sugieren tres posibles introducciones separadas de la broca en América y, que el este de África fue el origen de las introducciones de la plaga en América y Asia (Andreev et al. 1998, Benavides et al. 2005, Gauthier 2010).

1.2. Biología y ecología de la broca del café

La broca del café es un insecto holometábolo y multivoltino que vive en el interior de las semillas del café (Le Pelley 1973). Se considera un organismo de tipo “haplo-diploide funcional” o “pseudo-arrenotoquio”, debido a que durante la embriogénesis o espermatogénesis, el material genético del macho se degenera de tal forma que el material genético de la hembra se transmite a la descendencia casi siempre en su totalidad (Brun et al. 1995, Andreev et al. 1998, Constantino et al. 2011). Cada hembra perfora un solo fruto de café en la zona apical y barrena galerías irregulares en el

endospermo del grano donde deposita aproximadamente de 2 a 3 huevos por día durante un periodo aproximado de 131 días (incluyendo días sin ovoposición) (Hargreaves 1935, Bergamin 1943). Las larvas emergen de los huevos, y conforme se desarrollan se alimentan del grano de café. Al final de su desarrollo, las larvas pasan a estado de prepupa (dos días) y a estado de pupa (cinco días), antes de transformarse en adultos. Una sola hembra coloniza a un solo fruto y allí se desarrolla su descendencia. Cuando las pupas se transforman en adultos, las hembras hijas se aparean con sus hermanos antes de abandonar el fruto (Waterhouse y Norris 1989, Barrera et al. 2006). Los machos, más pequeños y diez veces menos numerosos que las hembras, no vuelan porque tienen alas atrofiadas, y por eso no participan en el proceso de dispersión de la población (Baker y Barrera 1993, Mathieu et al. 1997, López-Guillén et al. 2011). Se ha observado que bajo condiciones experimentales los machos son capaces de inseminar a varias hembras, con un promedio de inseminación de tres hembras por día (Silva et al. 2012).

1.2.1. Factores que influyen en la emergencia

Entre la información disponible sobre los factores que influyen en la emergencia de broca del café, se sabe que la alta intensidad lumínica y la presencia de frutos verdes cerca de los frutos infestados promueven la emergencia de las hembras (Mathieu et al. 1997). También la temperatura juega un papel importante en determinar el rango de desarrollo y emergencia al iniciar el nuevo ciclo de infestación (Jaramillo et al. 2010). Se ha comprobado que la lluvia, especialmente al final de la cosecha y durante periodos de sequía, provoca emergencia masiva de adultos que se encuentran en los frutos residuales o remanentes, ya sean dispersos en el suelo, los cuales cayeron después de la sequía donde la siguió desarrollándose para luego dispersarse; o en frutos que permancieron en los cafetos después de terminada la cosecha, los cuales se convierten en frutos secos de color negro, y los que están infestados, contienen generalmente solo adultos de *H. hampei* (Baker et al. 1992, Baker y Barrera 1993, Baker et al. 1994; Mathieu et al., 1997; Barrera et al., 2005). También, este fenómeno de emergencia está relacionado con las condiciones fisiológicas de la broca, ya que la hembra adulta abandona el fruto después de aparearse y alcanzar su melanización cuticular completa (Silva et al. 2014). Por otro lado, se considera que el status de especie sinovigénica hace

que la alimentación puede influir en la melanización, y en consecuencia, en su emergencia (Giordanengo 1992).

1.3. Dispersión

En los insectos herbívoros, la dispersión es la habilidad que estos organismos muestran para desplazarse con el objetivo de localizar un hospedero que facilitará su desarrollo, flujo genético, perpetuidad y adaptabilidad (Kim y Sappintong 2013). Las condiciones del hábitat (p. ej. recursos, heterogeneidad, condiciones ambientales), pero principalmente el mecanismo y capacidad de dispersión del insecto, son factores que influyen en la localización de una planta hospedera (Nathan et al. 2003, Schowalter 2006).

La dispersión entre hospederos aledaños o plantas vecinas al sitio de desarrolló, se realiza por medio de vuelos cortos, o por medio de vuelos largos o migraciones, en búsqueda de plantas hospederas lejanas. Estos vuelos son influenciados por diferentes factores bióticos tales como la heterogeneidad del paisaje o espacio, el nivel de desarrollo y estado fenológico de su hospedero. Igualmente, pueden actuar factores físicos como temperatura, humedad, precipitación, corrientes de viento, y luminosidad. Debido a la multiplicidad de factores, los vuelos pueden ser inadvertidos o direccionados (Foster 2005, Gámez-Virúes et al. 2012, Johnson 1970, Levins y Wilson 1980, Pearson 2002).

1.3.1 Situación de la dispersión de *H. hampei*

Diversos estudios indican la influencia de factores abióticos y bióticos en el comportamiento de búsqueda de hospedero por parte de las hembras colonizadoras de la broca (Baker et al. 1992, Giordanengo et al. 1993, Mathieu et al. 1997, 1999, López-Guillén et al. 2011). La mayoría de los estudios se han enfocado en mejorar los sistemas de trapeo para la captura masiva con fines de monitoreo y control de la plaga (Barrera et al. 2006, Dufour y Frérot 2008). Al igual que numerosas especies de la subfamilia Scolytinae, los adultos de *H. hampei* están predispuestos a la dispersión por su aptitud a volar, y por consiguiente, a buscar nuevas plantas hospederas (López-Guillén et al. 2011, Vega et al. 2015).

En las zonas tropicales de México y Centroamérica, el ciclo fenológico del cultivo de café, especialmente el desencadenamiento de las floraciones y fructificaciones, está

determinado por dos épocas distintas: seca y lluviosa, lo que induce a una cosecha anual (Dufour et al. 1999). Estas épocas marcan el paso a dos periodos importantes en la bioecología de la broca: uno que corresponde a la mayor dispersión de las hembras colonizadoras, y el otro a la colonización de los frutos de café.

El primer periodo, donde ocurre la mayor dispersión de las hembras colonizadoras, está asociado con la época seca, después de la cosecha y antes del desarrollo de los nuevos frutos, periodo conocido como intercosecha, que se caracteriza por una menor disponibilidad o ausencia de frutos de café viables para el desarrollo y reproducción de la broca (Baker 1984, Baker et al. 1992, Mathieu et al. 1997, Dufour et al. 2000, 2007). En este periodo, la población de la broca, casi enteramente constituida por adultos, habitará en los frutos remanentes que quedaron adheridos a las ramas o caídos al suelo, donde se refugiará para sobrevivir ante el clima inhóspito y al ataque de depredadores (Barrera et al. 2006). Ahí, las hembras entran en un estado de “diapausa reproductiva” (Mansingh 1991, Barrera et al. 2005). Una vez que ocurren las primeras lluvias, se rompe la diapausa reproductiva y las brocas hembras emergen en masa en búsqueda de nuevos frutos a colonizar (Mathieu et al. 1997, Barrera et al. 2006). En torno a este proceso surgen algunas preguntas que requieren respuesta para entender mejor la bioecología de este insecto, como ¿Qué ocurre con las hembras que abandonaron los frutos residuales y no encontraron disponibilidad de frutos? ¿En qué tipo de sustratos pueden sobrevivir las hembras colonizadoras en ausencia de frutos de café? ¿Cuál es el efecto de la lluvia sobre la sobrevivencia de la broca cuando está fuera del fruto? ¿Cuántos vuelos pueden realizar las brocas colonizadoras después de abandonar los frutos residuales?

El segundo periodo en la bioecología de la broca, correspondiente a la época de lluvia, que caracteriza por presentar una mayor disponibilidad de frutos hospederos viables en proceso de desarrollo y maduración. A diferencia del periodo intercosecha, donde no ocurre una emergencia masiva, ya que las condiciones ambientales promueven una emergencia continua en las hembras, es decir, las brocas salen de los frutos infestados conforme alcanzan su madurez y después de aparearse. Por lo tanto, comparado con el periodo de seca, en el periodo de lluvia se capturan muy pocas brocas en las trampas cebadas con atrayentes (Barrera et al. 2006). Como consecuencia de la

disponibilidad de frutos adecuados para la reproducción, la plaga se multiplica rápidamente durante la época de lluvia, lo que ocasiona importantes pérdidas en la producción del fruto si no se pone en acción un programa de control.

1.3.2. Técnicas de estudio

Por la complejidad del proceso de dispersión espacio-temporal, su estudio se realiza con la implementación de técnicas directas e indirectas. Los directos utilizan la técnica de marcaje-liberación-captura, la cual consiste en marcar los insectos y su posterior liberación (Hagler y Jackson 2001), con el objetivo de capturarlos para determinar la distancia recorrida desde el punto de liberación (Whitehead y Peakal 2012). En el caso de la broca, las técnicas de estudio directo se basan en la captura de las hembras voladoras en proceso de dispersión, siendo el trapeo la técnica más utilizada. Por lo mismo, se han diseñado varios tipos de trampas –algunas más elaboradas que otras–, en cuanto a color, tamaño y forma, pero todas usando como atrayente una mezcla de metanol y etanol (Barrera et al. 2006, 2008). Mientras que, la técnica de marcaje-liberación-captura en el complejo café-broca es un sistema relativamente nuevo, por lo que su aplicación ha sido limitado.

Los indirectos se basan en el estudio del monitoreo de las poblaciones y de las características que indican la capacidad y tendencia de dispersión de los individuos (Johnson 1970, Osborne et al. 2002). Están enfocados a:

- 1) Estudiar del aparato reproductor femenino para determinar la presencia de espermatozoides y condición de los óvulos. Rubio et al. (2008) reportaron que el tracto genital de *H. hampei* ocupa un promedio de 76% del cuerpo del insecto y que está conformado por ovarios, gemario, vitalerio, filamento terminal, oviducto lateral, oviducto común, glándula accesoria y espermateca. Dado que estos autores omiten el estudio de la estructura completa de la espermateca y su contenido, así como la morfología de los espermatozoides contenidos en los testículos de machos, se deben desarrollar y establecer técnicas para facilitar la observación detallada de este órgano y su contenido.
- 2) Propensión al vuelo de insectos que poseen músculos y alas, bajo condiciones de laboratorio o campo. En algunos casos, inducir el vuelo requiere elaborar dispositivos que faciliten la inducción del vuelo. Por ejemplo, en las cámaras de emergencia la luz natural

induce la emergencia y vuelo; o bien, uso de plataformas para facilitar el despegue y vuelo de los insectos (Castillo et al. 2006). En estudios del vuelo de hembras adultas de *H. hampei*, bajo condiciones de laboratorio, Baker (1984) observó que éstas pueden volar libremente por un periodo mayor a 22 min, exhiben un control fino del movimiento y una tendencia a flotar y avanzar muy lentamente, pero que en una sucesión de vuelos los insectos podían volar hasta 3 h. A pesar de estos reportes, aun con estas interesantes observaciones, aún hace falta estudiar el rango de dispersión de la broca.

3) Estudió de la morfología de las alas, particularmente la condición de los músculos, y la cantidad de energía que almacenan. Con esta información se determinará el desplazamiento del insecto por desgaste de alas y músculos o si tiene la capacidad de desplazarse, ya que una parte de la energía almacenada en insectos migratorios es utilizada para el desplazamiento y otra para la oviposición (Dixón et al. 1993, Johnson 1970). En *H. hampei*, se reportaron siete tipos diferentes de músculos alares; el área superficial de estos músculos en hembras voladoras son significativamente más largos que los de las hembras que han ovipositado (López-Guillén et al. 2011).

4) Cantidad y presencia de hormonas que estimulan el proceso de dispersión. Se conoce que la concentración de hormonas, como la hormona juvenil, varía conforme se desarrollan los insectos (Roff 1986), pero los estudios de este tema sobre la broca del café aún son limitados (López-Guillén et al. 2011).

5) Técnicas moleculares ecológicas. Estos utilizan información genética cualitativa y cuantitativa para determinar la migración o dispersión (Hoy 2013). Al respecto, Gauthier y Rasplus (2004) determinaron que siete microsatélites permiten el análisis de la variabilidad genética de *H. hampei*; posteriormente, cuatro de estos microsatélites fueron utilizados por Gauthier (2010) para evaluar la homogeneidad de la población de *H. hampei*, la ausencia o presencia de múltiples unidades genéticas y, la distribución geográfica de la plaga a través del tiempo, Gauthier (2010) clasificó las muestras de brocas hembras provenientes de 18 países y tres regiones (África, Asia y, Centro y Sur América), en cinco unidades evolutivas morfocrípticas, donde las muestras analizadas presentaron una amplia variación, que aún es inexplicable pero que limita la presencia de una depresión de la especie por endogamia.

CAPÍTULO 2

Desarrollo de técnicas

2.1. Descripción de los espermatozoides y espermateca de *H. hampei*

Los resultados de esta sección se encuentran en el artículo: Description of the Sperm and Spermatheca of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) for the Differentiation of Mated and Unmated Females.

Manuscrito publicado en la revista indexada: Annals of the Entomological Society of America, doi: 10.1093/aesa/sax033.

1. Journal: *Annals*

Section: Morphology,
histology, and fine structure

Running head: Sperm and
spermatheca of

Hypothenemus hampei

Juan F. Barrera

El Colegio de la Frontera Sur

(ECOSUR), Carretera Antiguo

Aeropuerto km 2.5, C.P. 30700;

Tapachula, Chiapas, Mexico.

Tel. +52 962-62-898-00, Fax: +52

962-62-898-01.

E-mail: jbarrera@ecosur.mx

Description of the sperm and spermatheca of *Hypothenemus hampei* (Ferrari)
(Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) for the differentiation of mated and unmated
females

ARIANA KARINA ROMÁN-RUIZ,^{1,2} BRUNO MICHEL,^{2,3} BERNARD P. DUFOUR,² JULIO
C. ROJAS,¹ LEOPOLDO CRUZ-LÓPEZ,¹ AND JUAN F. BARRERA^{1,4}

¹ El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Agricultura, Sociedad y Ambiente, Carretera
Antiguo Aeropuerto km 2.5, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, Mexico.

² Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le
Développement, Bioagresseurs: Analyse et maîtrise du risque UPR 106, F-34398
Montpellier, France.

³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le
Développement, UMR, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations , 755 Avenue
du Campus Agropolis, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez, France.

⁴ Corresponding author, e-mail: jbarrera@ecosur.mx

Abstract

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), is a major insect pest of coffee crops worldwide. As part of a program of studies aimed at efficient and sustainable pest control, a study was conducted to determine the mating status of adult females in the broader context of studying pest dispersal behavior. To that end, it was deemed important to determine the morphology of the *H. hampei* female reproductive tract. This study focused on direct observation of the spermatheca of unmated, and colonizing adult females obtained from natural field populations with a high probability of having mated, and the description of all organs of the reproductive tract using established standard staining and microscopy techniques. Spermathecae were extracted from the samples and sorted according to their origin (unmated or colonizing females). The morphology of sperm presents in the female spermathecae was compared with that of sperm taken directly from male testes. Two staining techniques using Giemsa and chlorazol black allowed spermatheca and sperm to be distinguished from other tissues. Under these conditions, a more precise description of the spermatheca was achieved, including the spermathecal duct and spermathecal muscles, spermathecal gland and, for the first time, sperm when present. These techniques permitted the accurate and rapid determination of the presence or absence of sperm in the spermathecae of *H. hampei* females, thereby establishing their mating status.

Key words: Coffee berry borer, spermatheca, sperm, insemination, staining techniques; mating status

Introduction

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), is a major insect pest of coffee crops worldwide (Le Pelley 1973, Waterhouse and Norris 1989, Barrera 2008, Vega et al. 2015). It is a multivoltine insect that lives in the fruits and seeds of several species of the genus *Coffea* in the tropics. Each CCB female perforates the apical zone of a coffee fruit and bores irregular galleries in the endosperm of the coffee bean, where she lays 25-35 eggs in several small groups over a period of 30-35 d. The larvae emerge and feed on the coffee bean as they grow and further expand the galleries. At the end of their development, the larvae pass through a prepupal stage of two d and a pupal stage of five d, before they reach the adult stage. Female adults mate with their male siblings inside the coffee bean where they developed and then leave the coffee fruit to fly off for colonizing new coffee fruits. Females are more numerous than males in a proportion of 10 to 1 and they are responsible for dispersal because males cannot fly (Baker and Barrera 1993, Mathieu et al. 1997, López-Guillén et al. 2011). Sex determination in *H. hampei* is a complex process where sometimes the loss of a paternal chromosome in the embryonic or spermatogenic stage, results in a haploid and pseudo-arrhenotokic organism (Brun et al. 1995).

During the dry season after harvest and before new fruits develop, a period that is known as the intercropping period, females congregate inside dry, black, unharvest or residual fruits to avoid extreme weather conditions and natural enemies (Barrera et al. 2006). In this refuge, that is unsuitable for insect development or reproduction, it is assumed that *H. hampei* females enter a state of “reproductive diapause” (Mansingh 1991, Barrera et al. 2005). As a consequence of this adaptive mechanism, a single residual fruit can be a refuge for several dozen females. Then, as the first rains arrive, colonizing CBB adult females emerge en masse, flying to the higher vegetation strata to disperse (Mathieu et al. 1997, Barrera et al. 2005). The presence of residual fruits infested with CBB females are, therefore, potential foci of infestations for the following cycle of coffee berry production (Barrera et al. 2006).

Some authors have reported that a large fraction of *H. hampei* females involved in the coffee fruit colonization process have been previously inseminated (Barrera et al. 2006,

López-Guillén et al. 2011). Despite this, the mating status of females prior to fruit colonization remains poorly documented.

In the context of an overall study of colonizing adult female behavior, it is essential to have information on the mating status of females (virgin or inseminated). To that end, it is necessary to examine and analyze the reproductive tract (Führer 2004, Ilango 2005). To achieve this goal, the following two aims were established: 1) to develop techniques for dissecting, mounting and staining the spermatheca and sperm of *H. hampei*, given that few microscopy techniques have been developed for this species, and 2) to describe the spermathecal complex of the spermatheca of *H. hampei*, in order to improve our understanding of the role played by this organ in the storage and fertilization process.

Materials and methods

Biological material

This study focused on adult males and two kinds adult females of *H. hampei*: unmated or virgin adult females obtained from isolated pupae, and colonizing adult females obtained from field with a high probability of having mated (López-Guillén et al. 2011).

The pupae and colonizing adult females of *H. hampei* used in the experiments were obtained from coffee crops near Soconusco, Chiapas, Mexico during the intercropping period (January to May, 2013). Collected infested coffee berries (*Coffea* spp.) and adult females caught with ECOIAPAR traps baited with an alcohol mixture of methanol-ethanol, 3:1 (Barrera et al. 2006), were used to obtain pupae and colonizing adult females, respectively. The pupae were extracted from coffee berries and were placed individually inside 2-ml Eppendorf tubes and kept under laboratory conditions ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 50-70%) until the adults hatched. The colonizing adult females caught with traps were stored in 96% ethanol until use. Adult males were extracted from coffee berries and were kept under the same conditions as colonizing adult females.

Dissection of females and males

The samples were processed at the entomology laboratory, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Baillarguet Campus, Monferrier-sur-Lez, France. Dozens of dissections of *H. hampei* unmated and colonizing adult females and some adult males

were carried out. Each specimen was positioned in dorsal view inside 1 ml of 70% ethanol for handling. A Wild Heerbrugg stereomicroscope (Heerbrugg, Switzerland), entomological forceps and a dissecting needle (number 00) were used to remove the elytra and abdomen. Then, each specimen *in vivo* (unmated females) was placed in 10% potassium hydroxide (KOH) for 5 h to soften the abdominal tissues. After this time, they were immersed in distilled water for 24 h to prevent tissue degradation caused by excess KOH for 5 h to soften the abdominal tissues; after this time, they were immersed in distilled water for 24 h to prevent tissue degradation caused by excess KOH (Dupuis 2005). Later, the samples were placed in 70% ethanol to remove dorsal tergites to expose and remove the spermatheca and testes. Before extraction, the spermatheca was photographed to show its position inside the female abdomen. The abdominal tissues of specimens stored in 96% ethanol (colonizing adult females and males) were not placed in KOH because they were enough soft for dissection.

Spermatheca and testes clarification techniques

Following several trials with KOH clarification of the *H. hampei* spermatheca, we optimized the sample clarification time for samples from unmated females (*in vivo* specimen) and samples from colonizing females and adult males stored in alcohol. Once the spermatheca from unmated females was removed it was placed in 10% KOH for 15 min, then immersed in distilled water for 15-20 min, and lastly placed in 95% ethanol for 15 min to facilitate fixation of the dye used. Due to the previous alcohol storage of colonizing females and adult males, the spermatheca or testes were placed in 95% ethanol for 15 min, then immersed in 1 µl of glycerol.

Spermatheca and testes staining techniques

Because observation of sperm stored in the spermatheca following female insemination is random and it is almost impossible to distinguish it without adequate staining, we used two staining techniques with dyes used in microscopic preparations of other insects: chlorazol black for Scaraboidea (Dupuis 2005) and Giemsa for carabids and mosquitoes (Takami 2002, Helinki and Knols 2009). Spermathecae prepared with glycerol but without dye were used as control. Three treatments were carried out: 1) Complete spermatheca

+ glycerol (S + GL), 2) Cut spermatheca + Giemsa stain (SC + GS), and 3) Cut spermatheca + chlorazol black stain (SC + BS). In the S + GL treatment, 1 μ l of glycerol was deposited on the slide where the spermatheca was placed; and for the SC + GS and SC + BS treatments, 1 μ l of glycerol + 1 μ l of dye was deposited on the slide and mixed, and the spermatheca was positioned after 1 min. The role of the glycerol was to fix the spermatheca on the slide and facilitate dye adsorption on the sample. The SC + GS and SC + BS samples were cut transversally into two or three parts to release the sperm and prepare a sperm suspension. This was left to stand for 30 min and 5 min, respectively. In order to observe clearly the morphology of male sperm, a suspension of sperm in glycerol was prepared. For it, the testicles were placed in 1 ml of glycerol and cut in three parts to release to the spermatozoa. Then, 1 μ l of suspension of spermatozoa was placed in 1 μ l of glycerol + 1 μ l of dye, deposited and mixed on the slide. All the samples were observed under a Dialux 20 EB, Leitz Wetzlar microscope (Wetzlar, Germany). Representative samples were photographed with a Leica 10445930 camera adapted to a Leica DM2500 microscope (Wetzlar, Germany). After several tests focusing on staining time, we evaluated 20 spermathecas from unmated females, 30 spermathecas from colonizing females and 20 male testes with this technique. The chlorazol black staining technique was applied to the female genital tract to improve its observation and description.

Results

Recognition and morphology of the spermatheca

The spermatheca of *H. hampei* unmated and colonizing females was located in the abdominal terminal section; it exhibited an irregular shape, elongated and curved at the distal end and, given its dark brown natural color, it was easy to distinguish (Fig. 1).

*Spermatheca content identification according to the mating status of *H. hampei*.*

By comparing the spermatheca from unmated and colonizing females (S + GL, SC + GS and SC + BS), with and without staining, it was possible to observe the complete morphology of this organ with its components and content. For example, in the samples from unmated females we observed the cuticular spermatheca structure (CU), a

translucent and sclerotized tube called the spermathecal duct (SD) and a translucent substance (LIQ) emanating through an upper hole (HO) probably linking to the spermathecal gland (Fig. 2A). On the other hand, irregular filaments or spermathecal muscles (MU) located at the ends of the organ were observed in spermatheca from colonizing females. Also in these samples, there was a delimited duct with a mass of cells inside, which was difficult to identify without staining (GL + S) (Fig. 2B). In the stained samples (SC + GS and SC + BS), the mass of cells located inside the spermatheca was identified as sperm agglomeration (SPR) (Fig. 2C y 2D) because identical to the dyed testicular content of males (Fig. 3A). The sperm was observed as tiny, flimsy and homogeneous filaments, lilac when they were dyed with Giemsa, or dark green when chlorazol black dye was used. The sperm was observed too, congregated longitudinally inside the organ and stained in the spermatheca from all colonizing females (n=30). The figures 2C and 2D show that the mass of sperm retained its organ form though the spermatheca was totally or partially removed. Part of the blue-dyed spermathecal gland (SGL) was observed. At the opposite end, more sperm agglomeration was seen in contrast to that found near the SD connection (Fig. 2C and 2D). In the SC + GS treatment, the spermatheca from unmated females was stained light blue (Fig. 4A), and the tissues and internal liquid were stained pale lilac. This was unlike the intense color increase when spermatheca from colonizing females were analyzed, where muscle was stained clear red, the sperm was stained lilac, and the spermathecal gland was stained blue (Fig. 4B). A similar situation occurred with the SC + BS treatment, where the spermatheca from unmated females stained with dye displayed muscle stained dark green and the internal liquid stained light green (Fig. 4C). In contrast, the mass of sperm and muscles observed in spermatheca from colonizing females were stained dark green (Fig. 4D). When comparing the morphology of the sperms found in the female spermatheca with male testes, the similarity in morphology was confirmed (Fig. 3).

Spermatheca and the female genital tract

In the female reproductive system, the spermatheca was located between the accessory gland (AG) and the common oviduct (OC), where the SD connected it with the OC (Fig. 5). In addition, the muscles were located on the internal curvature of the distal section of

the organ. It was assumed that the SD and muscles were responsible for keeping the spermatheca in an upright and appropriate position. At the top of the spermatheca, cell agglomeration was observed on the curved distal end of the spermatheca. Although its function is unknown it is likely to be related to a spermathecal gland (SGL), whose function may be to attract and maintain sperm during the storage process (Fig. 5).

Discussion

Despite the apparent randomness of sperm storage inside the spermatheca of female insects, in this study the staining used facilitated the observation and description of these elements and spermathecal complex. Commonly, the dyes used in these analyses, Giemsa and chlorazol black, are used in many studies focused on anatomy and entomology morphometrics (Carayon 1969, Martínez 2002). In the case of stained spermatheca and surrounding tissues from *H. hampei* females, it was necessary to adapt this technique to optimize observation of the samples analyzed, and to determine the degree of clarification, dye concentration and immersion time. It was thus possible to standardize a staining technique to obtain clear and accurate results. In this work, the spermatheca were described as the presence or absence of sperm stored in them, which confirmed whether the female had been inseminated or not. We found that staining of the spermatheca from virgin or unmated females was lighter than in the case of colonizing females (Fig. 2A and 2B), as was observed with *Dendroctonus ponderosae* Hopkins adult females (Bleiker et al. 2013). This may be due to factors such as age, mating and feeding which can affect this variation in staining (Silva et al. 2014). The contrast effect obtained with the two dyes used showed that spermatheca from *H. hampei* have a spermathecal duct, spermathecal muscles, a spermathecal gland and sperm (depending on mating status), similar to those observed in other insects (Fig. 5) (Hallberg 1983, Ilango 2005, Raina et al. 2007, Klowden 2009, Chiang 2010; Arméndariz-Toledano et al. 2014).

It was also found that the spermatheca is located in the terminal abdominal end of the female between the accessory gland and common oviduct of the female genital tract (Fig. 1 and 5) (Rubio et al. 2008). It has irregular shape, brown coloration, elongation and curvature of the distal end, and its sclerotized. It is assumed that the spermatheca's function is temporary storage and maintenance of sperm up to the moment it is released

into the genital tract for egg fertilization to occur (Berry 1985, Fedina and Lewis 2008, Rubio et al. 2008, Klowden 2009, 2013). Furthermore, an agglomeration of cells was observed at the upper end of the *H. hampei* spermathecal duct, where a larger amount of sperm was found compared to the remaining spermathecal structure. We assumed that this organ might be the spermathecal gland given the large similarities with other insects. In *Anthonomus grandis* Boheman (Villavaso 1975), *Ips typographus* (L.) (Hallberg 1983) and *Aedes aegypti* (L.) (Pascini et al. 2012), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Bloch-Qazi et al. 1998), and some species of Scarabaeoidea (Dupuis 2005), the presence of a spermathecal gland has been reported, which is responsible for filling and sperm maintenance, and its structure is similar to the agglomeration of cells observed in *H. hampei*. However, a further study will be necessary to confirm this finding and determine gland function.

Few works have focused in studying the spermathecal complex and the spermatheca of scolytids and more specifically to that of *H. hampei*, even though has a structure with taxonomic value for the classification of species as the case of *Dendroctonus frontalis* Zimmermann or the genus *Xyleborus* Eichhoff (Armédariz-Toledano et al., 2014; Perez-Silva, 2014). Rubio et al. (2008) reported that the genital tract of *H. hampei* occupies an average of 76% of the body of the insect, consisting of ovaries, gemario, vitalerio, terminal filament, lateral oviduct, common oviduct, accessory gland and spermatheca. In addition to these organs, we described the spermathecal complex, mainly the spermatheca and its content.

The spermathecae from unmated females of *H. hampei* displayed a translucent secretion with an unknown function whose staining depended on the dye used. Bloch-Qazi (2003) and Chiang (2010) reported that secretions surrounding the spermatheca in other insects may serve to maintain the viability of sperm. Moreover, in colonizing adult females of *H. hampei* sperm was observed as a mass of tiny elongated tangled filaments lilac when they were dyed with Giemsa, or dark green when chlorazol black dye was used, distributed throughout the spermatheca. This finding was compared with male observations, where long filaments were seen tangled inside testes, which were stained similarly to sperm stored in the spermatheca (Fig. 3). The morphology of stored sperms observed inside the

spermatheca was similar to tiny elongated tangled filaments that described in *A. aegypti* (Pascini et al. 2012) and *Drosophila bifurca* Patterson and Wheeler (Pitnick et al. 2009). A previous study described the testes as the biggest structures of the male reproductive system of CBB (Rubio et al. 2008); but they did not study the stored spermatozooids. However en nuestro trabajo, la comparación morfológica y colorimétrica de la espermateca de hembras y testículos de machos, permitió identificar a los espermatozoides fácilmente. Razón por la que, este es el primer reporte de la morfología de los espermatozoides de *H. hampei*.

Our study showed that all colonizing females that were analyzed with these staining techniques (n=30) were inseminated. This finding suggests that a large fraction of *H. hampei* females involved in the coffee fruit colonization are inseminated, and confirms that their male siblings inseminated them before they leave the parental fruit, as it has been previously proposed (Le Pelley 1973, Waterhouse and Norris 1989). In order to document the mating status of *H. hampei* in field and to test the methodology proposed in this paper, we sampled a population of colonizing females during the intercropping period of coffee in Chiapas, Mexico in 2014 and 2015, and their spermathecae were analyzed with the staining technique with Giemsa; we found that more than 96% of these females per analyzed sample were inseminated (A.K.R.R. unpubl. data).

In conclusion, the staining techniques with Giemsa and chlorazol black dyes allowed us to see the spermatheca clearly, as well as the organ recognized as being the spermathecal gland, and storage in this organ of sperms similar to those observed in male testes. Thus, with these techniques we were able to identify accurately and quickly the absence or presence of sperm in the spermathecae of *H. hampei* females, and consequently their mating status. With its better performance in tissue differentiation and its easy application on numerous samples, the technique described in this study is a useful tool for future biology studies of this pest.

Acknowledgements

We would like to thank Enrique López, Giber González and Javier Valle-Mora of ECOSUR, for their technical contribution. We are grateful to “Biologie Intégrative des Interactions Hôtes-Parasitoïdes” unit from the University of Montpellier 2, France, for providing the Giemsa dye, as well as the ANSES laboratory at Monferrier-sur-Lez for facilitating access to photographic equipment. We also thank Peter Biggins and Trevor Williams for their valuable help in revising the English of this paper. Lastly, we thank the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) for financial support to A.K.R.R. through the doctoral scholarship (grant number 777606C).

References Cited

- Armendáriz-Toledano, F., A. Niño, B.T. Sullivan, J. Macías-Sámano, J. Víctor, S.R. Clarke and G. Zuñiga. 2014.** Two species within *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae): Evidence from morphological, karyological, molecular, and crossing studies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 107: 11-27.
- Baker, P.S., and J.F. Barrera. 1993.** A field study of a population of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), in Chiapas, Mexico. *Trop. Agric.* 70: 351- 355.
- Barrera, J.F. 2008.** Coffee pests and their management, pp. 961-998. *In* J. L. Capinera (ed.), *Encyclopedia of Entomology*. 2nd ed. Springer.
- Barrera, J.F., J. Herrera, and J. Valle. 2005.** Efecto de la altura de la trampa en la captura de la broca del café: implicaciones en dispersión y muestreo. *Folia Entomol. Mex.* 4: 542-546.
- Barrera, J.F., J. Herrera, A. Villacorta, H. García, and L. Cruz-López. 2006.** Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*, pp. 71- 83. *In* J.F. Barrera and P. Montoya (eds.), *Simposio sobre Trampas y Atrayentes en Detección, Monitoreo y Control de Plagas de Importancia Económica*. Sociedad Mexicana de Entomología and El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, Mexico.
- Berry, S.J. 1985.** Reproductive systems, pp. 437-466. *In* S. B. Murray (ed.), *Fundamentals of Insects Physiology*, John Wiley and Sons, Inc., N.Y.
- Bleiker, K.P., R.J. Heron, E.C. Braithwaite, and G.D. Smith. 2013.** Preemergence mating in the mass-attacking bark beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 145: 12-19.
- Bloch-Qazi, M.C. 2003.** A potential mechanism for cryptic female choice in a flour beetle. *J. Evol. Biol.* 16: 170-176.
- Bloch-Qazi, M.C., J.R., Aprille, and S.M. Lewis. 1998.** Female role in sperm storage in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 120: 641-647.
- Brun, L.O., J. Stuart, V. Gaudichon, K. Aronstein, and R.H. French-Constant. 1995.** Functional haplodiploidy: a novel mechanism for the spread of insecticide

- resistance in an important international insect pest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9861-9865.
- Carayon, J. 1969.** Emploi du noir chlorazol en anatomie microscopique des insectes. *Ann. Soc. Ent. Fr.* 5: 179-193.
- Chiang, R.G. 2010.** A newly discovered sperm transport system in the female of Lygaeidae bugs. *Physiol. Entomol.* 35: 87-92.
- Dupuis, F. 2005.** L'abdomen et les genitalia des femelles de coléoptères Scarabaeoidea (Insecta, Coleoptera). *Zoosystema* 27: 733-823.
- Fedina, T.Y. and S.M. Lewis. 2008.** An integrative view of sexual selection in *Tribolium* flour beetles. *Biol. Rev.* 83: 151-171.
- Führer, E. 2004.** Polyploid spermatozoa in *Pityognes chalcographus* and *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Eur. J. Entomol.* 101: 21-27.
- Hallberg, E. 1983.** The spermathecal complex in *Ips typographus* (L.): Differentiation of the spermathecal gland related to age and reproductive state. *J. Insect Physiol.* 30: 197-202.
- HELINSKI, E.H., AND B.G.J. KNOLS. 2009.** Sperm quantity and size variation in un-irradiated and irradiated males of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* Patton. *Acta Trop.* 109: 64-69.
- Ilango, K. 2005.** Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotomine sandfly *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae): I. Ultrastructure and histology. *J. Biosci.* 30: 711-731.
- Klowden, M.J. 2013.** *Physiological Systems in Insects*. Third ed. Elsevier, USA.
- Klowden, M.J., 2009.** Spermatheca, pp. 1058-1059. *In* H. R. Vicent and R.T. Cardé (eds.) *Encyclopedia of Insects*. Academic Press. USA.
- Le Pelley, R.H., 1973.** *Las plagas del Café*. Editorial Labor, S.A. Barcelona, Spain.
- López-Guillén, G., J. Valdez-Carrasco, L. Cruz-López, J.F. Barrera, E.A. Malo, and J.C. Rojas. 2011.** Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. *Environ. Entomol.* 40: 441-448.
- Mansingh, A. 1991.** Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. *J. Coffee Res.* 21: 67-98.

- Martínez, M.I., 2002.** Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos. Bol. S.E.A. 30: 187-195.
- Mathieu, F., L.O. Brun, and B. Frérot. 1997.** Factors related with native host abandon by the coffee berry borer (Ferr.) (Col., Scolytidae). J. Appl. Entomol. 121: 175-180.
- Pascini, T.V., M. Ramalho-Ortigão, and G.F. Martins. 2012.** Morphological and morphometrical assessment of spermatheca from virgin and inseminated *Aedes aegypti* females. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 107: 705-712.
- Pérez, S.M. 2014.** Estudio del género *Xylorborus* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en México. M. Sc. Thesis, El Colegio de Postgraduados, Edo. de México, México.
- Pitnick, S., M.F. Wolfner, and S.S. Suarez. 2009.** Ejaculate-female and sperm-female interactions, pp. 247-304. In T.R. Birkhead, D.J. Hosken, and S. Pitnick (eds.). Sperm biology: An Evolutionary Perspective. Academic Press. London.
- Raina, A., C. Murphy, C. Florane, K. Williams, Y.I. Park, and B. Ingber. 2007.** Structure of spermatheca, sperm dynamics, and associated bacteria in Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 100: 418-424.
- Rubio, G.J.D., P.A.E. Bustillo, E.L.F. Vallejo, Z.J.R. Acuña, and M.P. Benavides. 2008.** Alimentary canal and reproductive tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Neotrop. Entomol. 37: 143-151.
- Takami, Y. 2002.** Mating behavior, insemination and sperm transfer in the ground beetle *Carabus insulicola*. Zool. Science 19: 1067-1073.
- Silva, W.D., C.C. Moreira, and J.M.S. Bento. 2014.** How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit? J. Insect Behav. 27: 729-735.
- Vega, F.E., F. Infante, and A. Johnson. 2015.** The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer, pp. 427-494. In F.E. Vega, and R.W. Hofstetter (eds.), Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species. Academic Press, Elsevier Inc. N.Y.
- Villavaso, E.J. 1975.** The role of the spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*. J. Insect Physiol. 21: 1457-1462.

Waterhouse D.F., and K.R. Norris. 1989. Biological control Pacific prospects-
Supplement 1. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra.
Australia.

Figures.

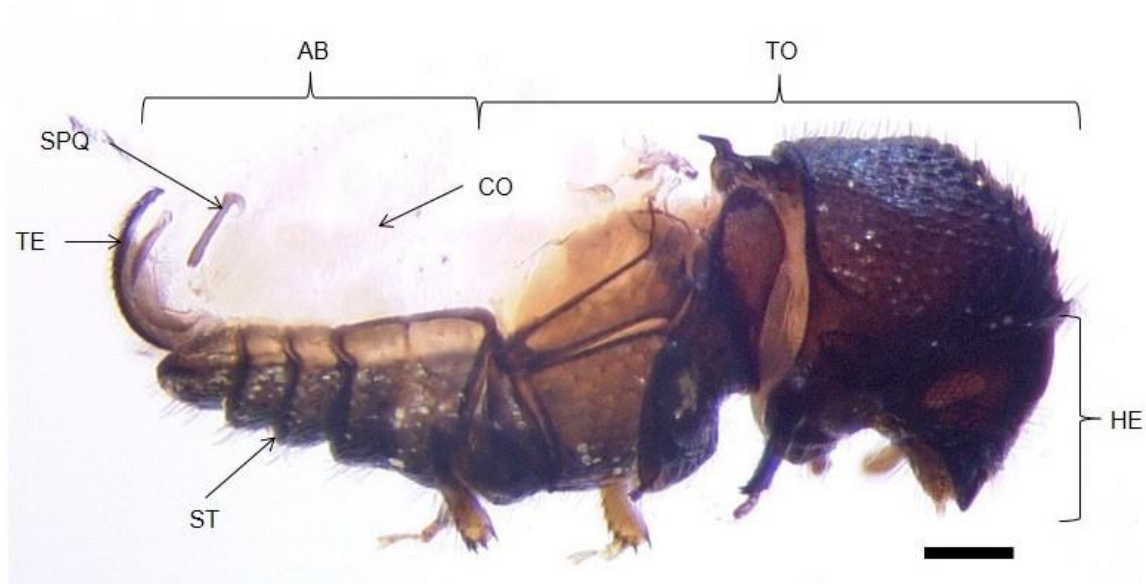


Fig. 1. Pleural view of female *H. hampei* indicating the spermatheca location. AB, abdomen; TO, thorax; HE, head; CO, contents; ST, sternites; TE, tergites; SPQ, spermatheca. Scale bar = 100 μ m.

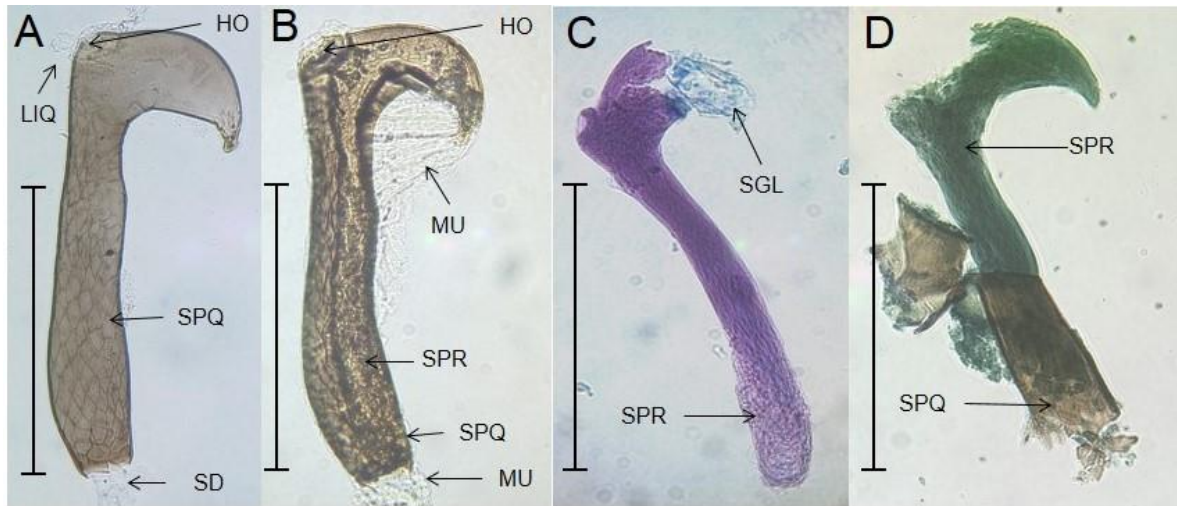


Fig. 2. Spermatheca contents of *H. hampei* immersed in glycerol and stained with Giemsa and chlorazol black dye. A) Spermatheca from virgin female treated with glycerol; B) Spermatheca from colonizing female treated with glycerol; C) Spermatheca from colonizing female stained with a mixture of Giemsa and glycerol (1:1); and, D) Spermatheca from colonizing female stained with a mixture of chlorazol black and

glycerol (1:1). HO, binding of spermatic gland with spermatheca; LIQ, liquid; SPQ, spermatheca; SD, spermatic duct; MU, muscle; SPR, sperm; SGL, spermathecal gland. Scale bar = 100 μ m.

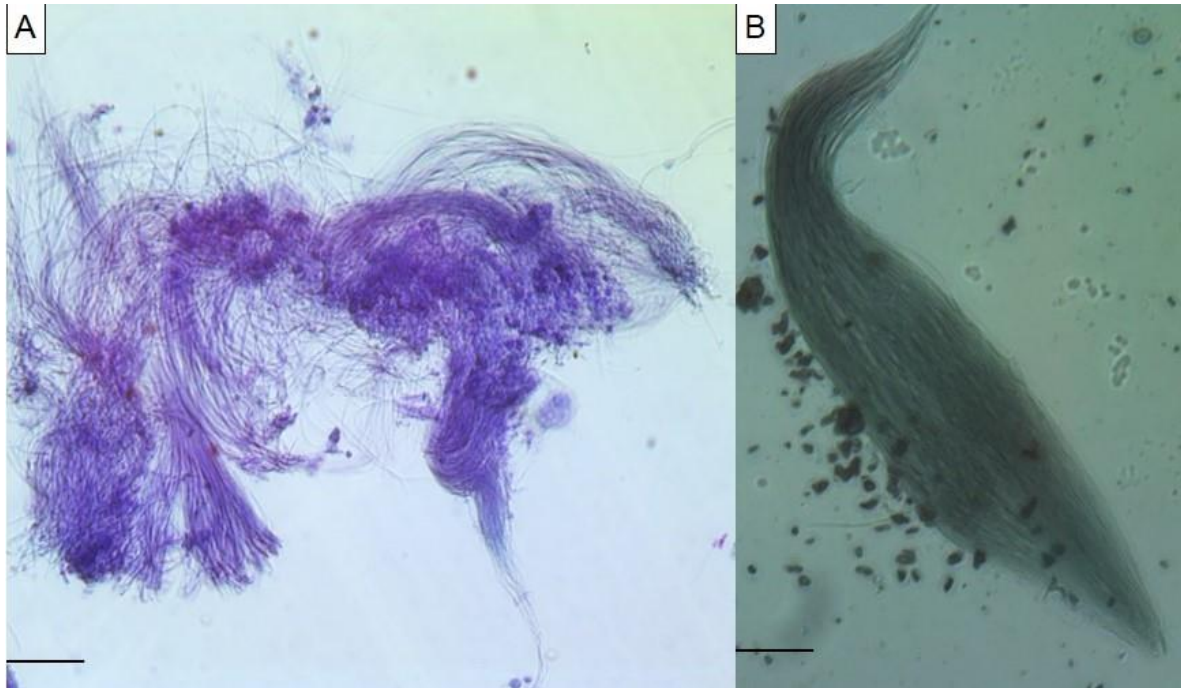


Fig. 3. Spermatozoa extracted from testicles of *H. hampei* stained with A) Giemsa and, B) chlorazol black.

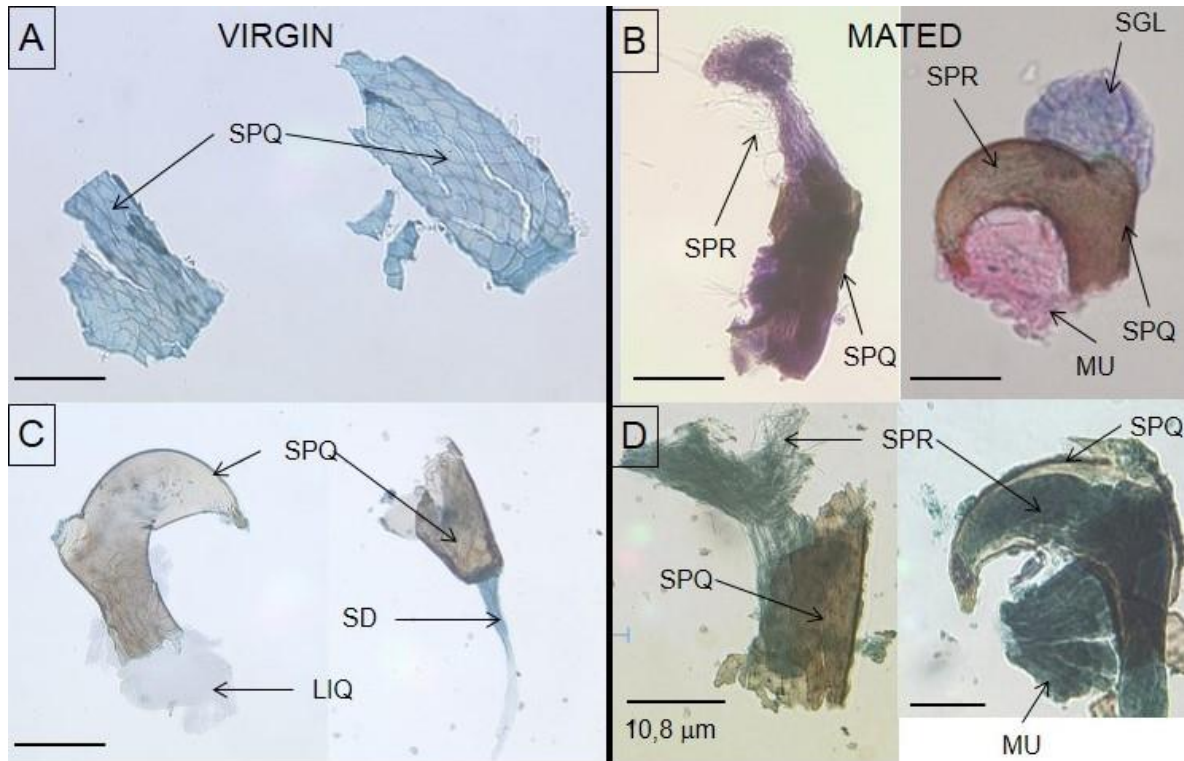


Fig. 4. Spermatheca from virgin and colonizing *H. hampei* females, cut and stained with Giemsa and chlorazol black. A) Spermatheca from virgin female stained with Giemsa; B) Spermatheca from colonizing female stained with Giemsa; C) Spermatheca from virgin female stained with chlorazol black; and, D) Spermatheca from colonizing female stained with chlorazol black. SPQ, spermatheca; LIQ, liquid; MU, spermathecal muscle; SPR, sperm; SGL, spermathecal gland. Scale bar = 10 μm .

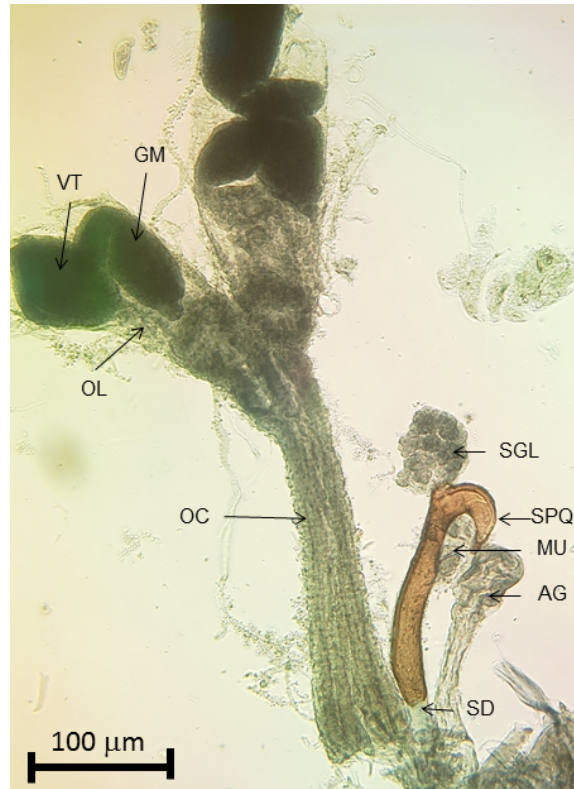


Fig. 5. Microscopic view of the reproductive system of *H. hampei* females. GM, germarium; VT, vitellarium; OL, lateral oviduct; OC, common oviduct; SD, spermatic duct; AG, accessory gland; MU, spermathecal muscles; SPQ, spermatheca; SGL, spermatic gland. Scale bar = 100 μm.

2.2. Induction of the emergence, take-off and flight of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae) colonizing females

INTRODUCTION

Large samples sizes are required in dispersal and insect behavioural studies (Franzén & Nilsson, 2007). For this reason that, insects have been mass reared in laboratory for have sufficient specimens with adequate characteristics as sex, reproductive state, and known age (Silva et al., 2014). However, insect populations subjected to mass-reared can may have negative effects on insect that reduce their performance in the field (Sørensen et al., 2012; Hough-Goldstein et al., 2014). Instead, to use wild insect obtained from their host is most suitable, although to induce their emergence can be difficult, especially in insect with cryptic habits. For that, to design an emergence induction device can allow obtaining large number of insect when needed.

Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae) or coffee berry borer, is a major pest in coffee crops worldwide (Le Pelley, 1968). It is a multivoltine and cosmopolitan pest with gregarious and cryptic behaviour (Bustillo 2006). Females bore irregular galleries in the endosperm, oviposit and their offspring to develop (Jaramillo et al., 2006). Once the adults emerge, the females mate with their siblings and they leave the native fruit in search of new places to colonize. On the other hand, males stay in the fruit all the time due their atrophied wings (Waterhouse & Norris, 1989; Mathieu et al., 1997; López-Guillén et al., 2011).

In Mexico and Central America, during dry period and before new fruits develop a period that is known as the intercropping period, some fruit unharvest and infested with CBB fall to the ground and start their decomposition, and adult females emerge massively. Females who not found an available host, they congregate inside dry, black, unharvest residual fruits from branches to avoid extreme weather conditions and natural enemies (Barrera et al., 2006). In this refuge, it is assumed that *H. hampei* females enter a state of “reproductive diapause” (Mansingh 1991, Barrera et al., 2005). As a consequence of this adaptive mechanism, a single residual fruit can be a refuge for several dozen females. Then, as the first rains arrive, colonizing CBB adult females emerge in masse and flying

to disperse (Mathieu et al., 1997, Barrera et al., 2005). The presence of residual fruits infested with CBB females are, therefore, potential foci of infestations for the following cycle of coffee berry production (Barrera et al., 2006). Thus, the residuals fruits may be a good opportunity for obtaining great numbers of CBB females when needed for flight behavior, mark-recapture or attraction-repulsion experiments. Therefore, the purpose of this study was to develop a technique to induce the emergence, take-off and flight of *H. hampei* colonizing females and a system to enable processing of a large number of airborne females when needed and faster to facilitate the CBB dispersal space-temporal studies.

MATERIAL AND METHODS

Study area. The study was conducted on the “La Alianza” farm, Cahahoatán, Chiapas, Mexico, located 670 masl (longitude -92.182778 and latitude 15.046667) in the interharvest period of January to May, 2013. The experimental area was in a 30 m² plot of *Coffea canephora* Pierre.

Biological materials. Residual coffee fruits of branches infested by *H. hampei* were collected from coffee crops near Tapachula, Chiapas, Mexico during the interharvest period (January to May, 2013) (Barrera et al., 2006). Fruits were stored in plastic containers (30 cm diameter x 12 cm deep) placed in 23°C \pm 2°C temperature, 70-80% relative humidity and completely darkness until their use to prevent the natural CBB emergence. Fruits were stored for at least two months after field collection and more time of storage was used as control to determinate the best biological material with large number of insects.

Emergence induction. From 09:00 h, 2500 infested residual fruits were immersed in water to induce emergence of the CBB. After 15 s, the fruits were removed from the water and they were placed in plastic containers with absorbent paper for 1-2 min to drain. Afterwards, the fruits were removed and dry them with absorbent paper and placed into an emergence device. This device is manufactured by black plastic container (72.5 cm of large x 31.5 cm of width x 27.5 cm of high). It was made six holes in the lid in each hole it

was attached a translucent plastic container (9.3 cm diameter x 16.5 cm high) (Figure 1). After CBB emerged from the fruits, females were attracted by light and they grouped in piece of paper towel placed in each container. CBB emergence was enhanced when the device was placed between 11:00-18:00 h under natural light. The CBB females emerged were collected with a fine bristle paintbrush and suction device. Only flying females when they emerged from the fruits were used in this study.

Take-off and flight platform. CBB females were placed on a platform to facilitate their take-off and flight. The platform was made of two polystyrene (31.3 cm x 23.8 cm) trays 20 cm apart to simulate a base and roof, and one polystyrene tray (16.5 cm x 11.5 cm) was placed between these trays 6 cm above the base. The trays were attached to each other with synthetic fibre yarn and wire (Figure 2).

Flying test. The take-off and flight platform was hung on a coffee tree branch in shade 1.30 m from the ground on which the coffee berry borers were released. To capture flying females, one BROCAP® trap baited with a methanol-ethanol mix in a proportion of 3:1 was positioned 1.5 m from the take-off platform.

The take-off and flight of the coffee berry borers was continuously observed from 11:00 h to 13:00 h at $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 70-90% relative humidity. During this time, 200 females were placed onto the take-off and flight platform and we recorded their take-offs and flight. Once our observations were complete, we recorded the number of CBB remaining on the take-off platform and the number of flying CBB was determined by the difference. Flying tests were carried out on seven consecutive days. The experiments were carried out on sunny days under moderate shade. For to determine how many females can be placed on device, groups of 100, 200, 300, 500 y 1000 CBB flying females were placed onto device. We recorded the number of CBB females remaining on device and the number of flying CBB was determined by the difference. These tests were carried out on consecutive days and during the time period of CBB's major activity (16:00 to 18:00 h) of interharvest period.

RESULTS AND DISCUSSION

The storage of residuals fruits at darkness avoided that CBB females emerged from coffee berries, and soon after the fruits were exposed to humidity and sunlight, CBB started to

emerge. The immersion in water of residuals fruits simulated the rain, and sunlight induced the CBB's emergence and flight. As of at 11:00 h, 20 to 50 CBB females emerged, but this emergence increased to 200-250 insect until 13:00 h. Within next 3 h, the emergence decreased. In period at 16:00-18:00 h, we observed 200 to more than 1000 CBB females per day emerged each hour and, consequently, we obtained more than 4000 females per one day between the period at 16:00-18:00 h.

In the case of time storage, the about 2500 residuals fruits stored in laboratory for at least two months after their collect produced more than 4000 females, due these fruits have enough quantity of CBB's flight females compared to control which had little emergence of flying females (20 females per day, aprox.). Then, the residual fruits stored at least two months were used and, flying test realized at 16:00 - 18:00 h due more flight activity of CBB females. Ours results confirm the observations of some authors, for example females emerging from 13:30 to 15:30 h (Borbón-Martínez et al., 2000), at sunset and from 16:00 to 18:00 h (Roepke, 1919; Leefmans, 1923), females exit the berry from 16:00 to 17:00 h (Leroy, 1936); and, the colonizing female activity in lab and field peaked at 14:00 h (Giordanengo, 1992). But, this CBB behaviour was observed under natural conditions and it depends of geographic distribution.

We observed that females walk few seconds, extended their elytra and, flew a few minutes. The platform was such that it allowed air flow that facilitated the take-off and flight of the females. In this device can be placed group of 500 females each 20 min or after the female's evaluated flight. A group of 1000 females placed onto device take more than 1 h for their take-off and flight. Some flying females were recovered and counted when they flew and were captured in the BROCAP® trap, but the rest flew to inaccessible places where they could not be captured, for example the higher strata (Mathieu et al., 1997; Barrera et al., 2006; Dufour & Frérot, 2008). In second and seventh days of flight test, more females were captured in the trap in comparison with other days because these days were cloudy (Table 1). But, while these are used with adequate conditions of temperature $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70-90% relative humidity and performance (14:00-18:00 h), they can be used anywhere.

In conclusion, the emergence device allowed to obtain large number of females and take-off and flight platform facilitated the flying females when needed. Thus, this

technique is a reliable and useful tool that can be used to obtain large numbers of flying female CBB faster than natural emergence and, to induce take-off and flight as easily and quickly as possible, which are useful for undertaking different studies on its biology and behaviour, and dispersal studies mainly.

Acknowledgements

We should like to thank Enrique López of ECOSUR, for his technical contribution. Lastly, we thank Peter Biggins for his valuable help in revising the English of this document. We also thank the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) for financial support to A.K.R.R. through the doctoral scholarship (grant number 777606C).

Literature cited

- Barrera JF, Herrera J, Valle J. 2005. Efecto de la altura de la trampa en la captura de la broca del café: implicaciones en dispersión y muestreo. *Entomología Mexicana* 4: 542-546.
- Barrera JF, Herrera J, Villacorta A, García H & Cruz-López L (2006) Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. Simposio sobre Trampas y Atrayentes en Detección, Monitoreo y Control de Plagas de Importancia Económica. Sociedad Mexicana de Entomología and El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, Mexico. Pp. 71- 83.
- Borbón-Martínez O, Mora Alfaro O, Cam Oehlschlager A & González LM (2000). Proyecto de trampas, atrayentes y repelentes para el control de la broca del fruto de cafeto, *Hypothenemus hampei* L. (Coleoptera: Scolytidae). Memoria, XIX Simposio Latinoamericano de Caficultura, San José, Costa Rica. Pp. 331-348.
- Bustillo AE (2006) Una revisión sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Revista Colombiana de Entomología* 32: 101-116.
- Dufour BP & Frérot B (2008) Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col. Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. *Journal of Applied Entomology* 132: 591-600.

- Franzén M & Nilsson SG (2007) What is the required minimum landscape size for dispersal studies? *Journal of Animal Ecology* 76:1224-1230
- Giordanengo P (1992) Biologie, eco-éthologie et dynamique des populations du Scolyte des grains de café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera, Scolytidae), en Nouvelle-Calédonie. Ph.D thesis, Université de Rennes I, Rennes, France.
- Hough-Goldstein J, Stout AR & Schoenstein JA (2014) Fitness and field performance of a mass-reared biological control agent, *Rhinoncomimus latipes* (Coleoptera: Curculionidae) *Environmental Entomology* 43: 923-931.
- Jaramillo J, Borgemeister C & Baker P (2006) Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* 96: 1- 12.
- Leefmans S (1923) De Koffiebessenboeboek (*Stephanoderis hampei* Ferrari= *coffeae* Hagedorn). I. Levenswijze en oecologie. Mededeelingen van het Instituut voor Plantenzieken 57: 1-93.
- Le Pelley RH (1968) Pests of Coffee, Longmans, Green and Co., Ltd. ed. London.
- Leroy JV (1936) Observation relatives à quelques insectes attaquant le Caféier. Publications de l'institut national pour l'étude agronomique du Congo Belge, Série Scientifique 8:1-30.
- López-Guillén G, Valdez-Carrasco J, Cruz-López L, Barrera JF, Malo EA & Rojas JC (2011) Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. *Environmental Entomology* 40: 441-448.
- Mansingh A (1991) Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. *Journal of Coffee Research* 21: 67-98.
- Mathieu F, Brun LO & Frérot B (1997) Factors related with native host abandonment by the coffee berry borer (Ferr.) (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 121: 175-180.
- Roepke W (1919) Gegevens omtrent de Koffiebessen-boeboek (*Stephanoderis hampei* Ferrari= *coffeae* Hgd.) Mededeelingen wan het Instituut voor Plantenziekten 38: 1-32.

- Silva WD, Moreira CC & Bento JMS (2014) How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit? Journal of Insect Behavior doi:10.1007/s10905-014-9464-2.
- Sørensen JG, Addison MF & Terblanche JS. 2012. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. Crop protection 38: 87-94
- Waterhouse DF & Norris KR (1989) Biological control Pacific Prospects-Supplement 1. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra.

Figures



Figure 1. Induction emergence device of *H. hampei* females colonizing.

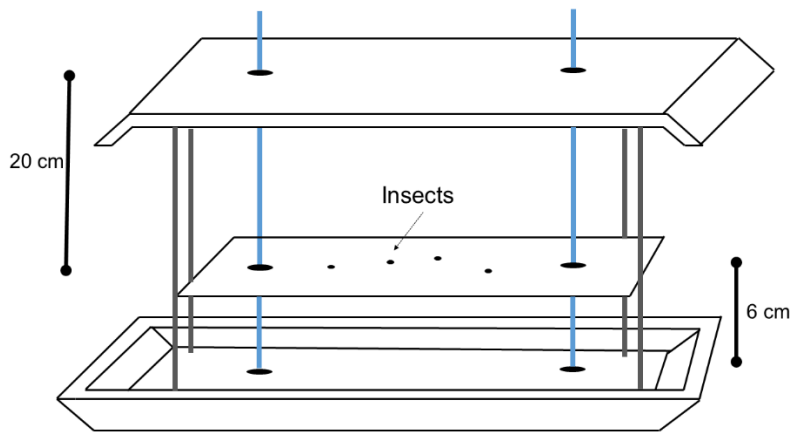


Figure 2. Design of *Hypothenemus hampei* takeoff platform.

Table 1. Flight and capture data for the *Hypothenemus hampei* females assessed in the flying evaluation.

DAY	FEMALES ASSESSED	FLYING FEMALES	CAPTURED FEMALES
1	200	200	0
2	200	200	21
3	200	200	8
4	200	200	0
5	200	200	5
6	200	200	0
7	200	200	11

CAPÍTULO 3

Dispersión temporal de *H. hampei*

3.1. Actividad estacional de vuelo y estado de apareamiento de hembras colonizadoras de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) durante el periodo intercosecha en el sureste de México

Resumen

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es una de las principales plagas del café a nivel mundial. Uno de los aspectos menos estudiados de la bioecología de este insecto es su dispersión en búsqueda de nuevos frutos hospederos; en particular, se requiere esclarecer el estado de apareamiento de las hembras colonizadoras durante el periodo intercosecha y el efecto de la inseminación y la alimentación sobre su capacidad de vuelo. Para ello, durante un año se monitoreó el vuelo de las hembras colonizadoras de *H. hampei* mediante trampas cebadas con metanol-etanol, y a través de tinción con Giemsa se determinó la presencia/ausencia de espermatozoides en las espermatecas de las hembras capturadas en el periodo intercosecha y los resultados se compararon con los de hembras extraídas de frutos residuales y hembras vírgenes procedentes de pupas. Se encontró que todas las hembras examinadas capturadas con trampas en el periodo intercosecha estaban inseminadas (98.4% con inseminación reciente y abundante presencia de esperma; 1.6% con inseminación vieja y escasa presencia de esperma o migración del esperma hacia la glándula espermática). En cambio, no todas las hembras extraídas de frutos residuales se habían apareado, registrando 89.5% de inseminación (84.5% con inseminación reciente; 5% con inseminación vieja) y 10.5% de hembras vírgenes. Por otro lado, se encontró que todas las hembras colonizadoras obtenidas mediante inducción de la emergencia de frutos residuales (hembras inseminadas alimentadas y no alimentadas) realizaron más de un vuelo, en tanto que ninguna de las hembras obtenidas de pupas extraídas de frutos maduros (hembras vírgenes alimentadas y no alimentadas) lo hicieron. De las hembras inseminadas, el 70% de las

no alimentadas realizaron más de un vuelo en comparación con el 40% de las que se alimentaron.

Palabras claves: inseminación, hembras vírgenes, hembras colonizadoras, tinción, espermatozoides, espermateca.

Introducción

Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), conocida comúnmente como la broca del café, es considerada una de las plagas más importantes de la cafeticultura moderna a nivel mundial (Le Pelley 1968, Damon 2000). Los machos son más pequeños y menos numerosos que las hembras (1:10), cuentan con alas atrófiadas, se presume que permanecen el mayor tiempo de su vida en el interior del fruto y que, únicamente, participan en el proceso de reproducción donde no expresan ni transmiten sus genes parentales, fenómeno conocido como haplodiploidia funcional (Waterhouse y Norris 1989, Brun et al. 1995, Mathieu et al. 1997, Damon 2000). Las hembras realizan galerías irregulares en el endospermo del fruto donde depositan sus huevos y se desarrolla su progenie (Barrera 1994, Jaramillo et al. 2006). Al término de la metamorfosis, las hembras se aparean con sus hermanos, abandonan el fruto y vuelan en busca de nuevos sitios de colonización (Baker et al. 1992, Waterhouse y Norris 1989, López-Guillén et al. 2011).

Las poblaciones de hembras colonizadoras sobreviven ante el clima inhóspito de la época inter cosecha en los frutos residuales dispersos en el suelo y adheridos a las ramas. Se presume que estas poblaciones se mantienen en un estado de “diapausa reproductiva” (Barrera et al. 2006) y representan un foco potencial de infestación para nuevas fructificaciones (Ticheler 1961, Barrera et al. 2006, Dufour et al. 2007).

La inseminación de las hembras jóvenes de *H. hampei* por sus hermanos antes de abandonar el fruto natal, así como su capacidad para realizar vuelos de dispersión, han sido mencionados por algunos autores. Mediante el método indirecto de observar la viabilidad de los huevos, Mathieu et al. (1997) determinaron que más del 90% de las hembras que salen de los frutos tenían una descendencia viable, mientras que Giordanengo (1992) se pronunció a favor de un mayor porcentaje de fertilidad. De la misma manera, Bergamin (1943) había señalado mucho antes que todas las hembras colonizadoras debían estar fertilizadas antes de salir de los frutos donde se habían desarrollado. Mediante el método directo de observar al microscopio la espermateca de hembras colonizadoras, López (1993) estimó una tasa de inseminación del 61.7%, mientras que; para el conjunto de las hembras presentes dentro de los frutos, dicha tasa fue de 78.3% de inseminación. Estos resultados son el producto de estudios que utilizaron

técnicas distintas, aplicadas en condiciones experimentales diferentes, lo que dificulta determinar con precisión el estado de apareamiento o inseminación de las hembras colonizadoras al momento de dispersarse; tampoco permiten saber si el estado de inseminación es estable en el tiempo o dependiente de una etapa precisa de la fenología del cafeto. En cuanto a las hembras vírgenes, se mencionó que no eran aptas al vuelo, y por lo tanto, que no podían entrar al estado de colonizadoras (Giordanengo 1992), sin embargo, esta afirmación se basa en un solo reporte que sería importante comprobar.

En el marco de esta problemática, el objetivo del presente trabajo fue determinar el estado de apareamiento de las hembras colonizadoras de *H. hampei* capturadas con trampas en distintos periodos del año, y compararlo con el de las hembras presentes dentro de frutos infestados. Para ello, se empleó el método directo de examinar la presencia/ ausencia de espermatozoides en las espermatecas desarrollado por Román et al. (2017). La presente investigación pretende contribuir en la comprensión de la dispersión de las hembras colonizadoras de *H. hampei* y los factores que la condicionan.

Materiales y Métodos

Área de estudio y material biológico

Los estudios de laboratorio se realizaron en El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) ubicado en Tapachula, Chiapas, México. Los insectos, los frutos de café y los sustratos fueron colectados en plantaciones de café de las fincas “La Alianza” y “La Concepción” localizadas en el municipio de Cacahoatán en la región del Soconusco, Chiapas en 2015 y 2016. El clima de esta región se clasifica como húmedo caliente-templado con una estación caliente lluviosa de junio a noviembre (Köppen 1918). Cabe mencionar, que en la finca “La Alianza”, diariamente se registraron los milímetros de precipitación pluvial durante un año de observación (julio 2015 a junio 2016).

Las hembras colonizadoras de *H. hampei* (individuos apareados o inseminados) se obtuvieron de frutos residuales de café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) (Ver sección 1.2.2). Los frutos residuales infestados se colocaron en recipientes de plástico (30 cm de diámetro por 12 cm de alto) con tapa cubierta con tela fina de organza para permitir la aeración y se almacenaron en un cuarto de laboratorio a 26-28°C, 70-

80% HR y semi obscuridad hasta la extracción de los insectos. Cada recipiente contenía aproximadamente 800 frutos.

Las hembras colonizadoras fueron extraídas de los frutos residuales almacenados induciendo la emergencia con agua (Baker 1984; Barrera 1994). Para ello, los frutos se sumergieron en agua y después de 15 s se extrajeron para secarlos con papel toalla y depositarlos en una cámara de emergencia descrita en el capítulo anterior (Fig. 1 de Sección 2.2.). Para favorecer la emergencia de la broca, las cámaras de emergencia se colocaron en condiciones de luz natural entre las 11 y 18 h. Cada cámara de emergencia contenía 2500 frutos aproximadamente.

Actividad estacional del vuelo

Para determinar la actividad estacional del vuelo de las hembras colonizadoras de *H. hampei*, se eligió la finca “La Alianza” (latitud: 15.046667, longitud: -92.182778 y altitud: 670 msnm). En esta finca se cultiva café robusta a una densidad de siembra de 5 x 5 m. En la plantación también crecían algunos árboles como *Tabebuia donnell-smithii* Rose (Bignoniaceae) y arbustos como *Cajanus cajan* (L.) Huth (Fabaceae). La floración del café se presenta por lo general en enero y febrero y la cosecha inicia en agosto y termina en febrero del año siguiente.

En esta finca se eligió una parcela de una hectárea de cafetos de 9 a 10 años de edad y sin árboles de sombra donde se colocaron 12 trampas ECOIAPAR para capturar las hembras colonizadoras. Las trampas fueron elaboradas usando botellas vacías de plástico (PET) de refrescos embotellados de 2 lts, a las cuales se les hizo una ventana en el centro de la botella para la entrada de los insectos y se les puso 400 ml de agua, aproximadamente, para capturar a los insectos atraídos (Barrera et al. 2006). Las trampas se cebaron con una mezcla de tres partes de metanol y una parte de etanol, se colgaron de ramas de cafetos a una altura de 1.5 m sobre el nivel del suelo y se colocaron a una distancia de 20 m entre ellas formando un rectángulo de 3 x 4 trampas, y cada 21 días el cebo fue renovado. Los insectos capturados se colectaron cada semana durante el periodo de julio de 2015 a junio de 2016.

Estado de apareamiento

Colecta de los especímenes. Tres tipos de hembras adultas de *H. hampei* fueron usadas para determinar su estado de apareamiento: i) Hembras colonizadoras colectadas en trampas; una muestra de las hembras atraídas a las trampas se separó y se almacenó en etanol al 96% hasta su uso. ii) Hembras obtenidas mediante disección de frutos residuales infestados por *H. hampei* colectados en campo; los frutos fueron colectados de ramas de cafetos en la primera y segunda semana de cada mes entre enero y junio de 2014 y 2015, lapso de tiempo que corresponde al periodo intercosecha. Los frutos fueron llevados al laboratorio donde se disecaron para extraer los adultos y posteriormente fueron almacenados en etanol al 96% hasta su uso. iii) Hembras (no apareadas) obtenidas de pupas extraídas de frutos infestados en campo; los frutos para extraer las pupas fueron colectados durante el periodo de fructificación, entre agosto y septiembre de 2016. Las pupas extraídas fueron confinadas individualmente en cajas Petri para evitar que los adultos se aparearan después de concluir la metamorfosis y se pusieron bajo condiciones de laboratorio ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 50-70% humedad relativa) hasta la emergencia de los adultos (Silva et al. 2014).

Extracción, clarificación y tinción de la espermateca. La espermateca de los tres tipos de hembras estudiadas fue extraída a fin de determinar su estado de apareamiento. Para ello, cada uno de los especímenes colectados fue disecado según la metodología descrita por Román-Ruiz et al., (2017), tanto para hembras colonizadoras como para hembras no apareadas (Sección 2.1). Un mínimo de 50 especímenes por tipo de hembra por mes de colecta fue disecado.

Para observar la posible presencia de espermatozoides como indicador del estado de apareamiento de los especímenes, las espermatecas extraídas fueron sometidas a la técnica de tinción de Giemsa de acuerdo a la técnica empleada por Román-Ruiz et al. (2017). De manera breve, esta técnica consiste en depositar 1 μl de glicerol más 1 μl de colorante Giemsa sobre un portaobjetos y un minuto después de mezclar estas sustancias, la espermateca se sumergió en la solución. Posteriormente, cada espermateca fue cortada transversalmente en dos o tres partes para facilitar la liberación de los espermatozoides y preparar una suspensión con ellos. Después de 30 minutos,

las espermatecas teñidas fueron observadas bajo un microscopio DIALUX 20 EB, Leitz Wetzlar.

Criterios para reconocer el estado de apareamiento. Para determinar si las hembras se habían o no apareado, se tomaron en cuenta las siguientes cuatro características (Cuadro 1): i) Intensidad de la coloración cuticular de la espermateca con Giemsa; ii) Delimitación de las paredes de la cutícula de la espermateca (canal); iii) Forma del abdomen y, iv) Presencia de espermatozoides. Con respecto a las hembras apareadas se distinguieron dos casos, según fueron jóvenes (abundantes espermatozoides en la espermateca) o viejas (espermateca vacía o con pocos espermatozoides, y presencia del canal espermático).

Efecto de la inseminación y la alimentación sobre el vuelo

Para determinar el efecto de la alimentación sobre el vuelo de *H. hampei*, se llevó a cabo un experimento con hembras emergidas de frutos –y por lo tanto con muy alta probabilidad de haberse apareado (hembras inseminadas) y naturalmente destinadas a volar para dispersarse–, y hembras obtenidas de pupas –y por lo tanto vírgenes no destinadas naturalmente a volar; cada uno de estos dos grupos se dividió a su vez en individuos alimentados y no alimentados, de tal manera que el experimento consistió en los siguientes cuatro tratamientos: i) hembras apareadas con alimentación, ii) hembras apareadas sin alimentación, iii) hembras no apareadas con alimentación, y iv) hembras no apareadas sin alimentación.

Las hembras apareadas se obtuvieron induciendo con agua la emergencia masiva de la broca de frutos residuales colectados en campo, y las hembras no apareadas se obtuvieron de pupas extraídas manualmente de frutos maduros infestados también colectados en campo. Las hembras así obtenidas fueron colocadas individualmente en recipientes de plástico de 13 cm de largo por 5 cm de diámetro cerrados con tapas horadadas cubiertas por tela fina de organza para facilitar la aeración. Los individuos a los que no se les ofreció fruto de café como alimento (sin alimentación) tanto apareadas como no apareadas, fueron evaluados desde el momento de su obtención. Después, estos fueron colocados con un pedazo de papel toalla en el interior del contenedor para evitar el desgaste físico. En el caso de las hembras con alimentación, las apareadas se

evaluaron en el momento de su obtención y después de su evaluación se le colocó un fruto de café rojo maduro dentro de su contenedor; en cambio, a las hembras no apareadas se les ofrecieron frutos de café rojo maduro durante cinco días consecutivos y al concluir el periodo se realizaron las pruebas de vuelo.

Para las pruebas de vuelo, las hembras experimentales fueron introducidas individualmente, alternando los tratamientos aleatoriamente, en recipientes traslúcidos de 16.5 cm de largo por 9.5 cm de diámetro cerrados con tela organza y durante 15 min fueron observadas para registrar si volaban; al volar el insecto, se suspendía la prueba. Cada cinco hembras observadas, los recipientes fueron lavados con jabón neutro y secados al ambiente, con la finalidad de eliminar olores.

En total, se evaluaron 208 y 240 hembras para los tratamientos de hembras apareadas alimentadas y no alimentadas, respectivamente y, 50 hembras por cada tratamiento de las hembras no apareadas con o sin alimento. Las pruebas se realizaron de 11 a 18 h, bajo condiciones de laboratorio de 24-28 °C y 60-75% HR.

Analisis estadísticos. Los datos obtenidos de la actividad estacional fueron analizados con el programa Excel 2013, y los datos obtenidos de las pruebas del efecto de la alimentación sobre el vuelo se analizaron con una prueba de Log-Rank k-muestras asintóticas y con una prueba de Tukey para comparación de variables múltiples con corrección de Bonferroni. Los análisis se realizaron con el paquete R v 3.0.0.

Resultados

Actividad estacional del vuelo

El estudio de trampeo en la finca “La Alianza” mostró que las mayores capturas de brocas colonizadoras de *H. hampei*, indicativo de la actividad de vuelo, ocurrieron de febrero a junio, periodo que correspondió a la intercosecha. Se observaron dos picos sobresalientes de actividad de vuelo, el primero el 17 de marzo y el segundo el 21 de abril de 2016; el primero ocurrió después de la primera lluvia fuerte del periodo intercosecha (40 mm) y el segundo al presentarse la siguiente lluvia fuerte (54.5 mm) del

periodo. Después del 21 de abril la época de lluvias se estableció en la región y las capturas de brocas disminuyeron paulatina pero constantemente (Fig. 1a).

Estado de apareamiento

De un total de 490 hembras colonizadoras capturadas con trampas cebadas con metanol-etanol entre abril y junio de 2014 y febrero y abril de 2015, un promedio de 98.4% presentaron una espermateca claramente inseminada; dichos periodos corresponden a la inter cosecha los cuales estuvieron regidos por el inicio del periodo de lluvia y por la disponibilidad de frutos residuales (Cuadro 2, Fig. 1b). Los espermatozoides contenidos en las espermatecas de estas hembras se observaron en abundancia (Fig. 2a) y no se observó ninguna hembra estrictamente libre de espermatozoides ni con características de la espermateca similares a las que presentaron las hembras vírgenes (Fig. 2b). En cuanto al restante 1.6 % de hembras, se observó que mostraron con claridad el contraste de la pared de la espermateca, característica que indica la presencia de esperma; también se observó presencia de espermatozoides cerca de la glándula espermática (muestras de 2014) y cerca de la conexión de la espermateca con el oviducto común en hembras viejas (muestras de febrero de 2015). Ninguna de estas características se presentó en las espermatecas de las hembras no apareadas o vírgenes. El porcentaje de inseminación fue idéntico para ambos años.

Por otro lado, de un total de 150 hembras extraídas de frutos residuales de febrero a mayo de 2016, el 84.5 % en promedio estuvieron recién inseminadas, 5% mostraron haber sido inseminadas desde más tiempo atrás y 10.5% se encontraron vírgenes (Cuadro 3).

Efecto de la inseminación y la alimentación sobre el vuelo

Se observó que todas las hembras colonizadoras de *H. hampei* obtenidas mediante inducción de la emergencia de frutos residuales (alimentadas y no alimentadas) realizaron más de un vuelo, en tanto que ninguna de las hembras obtenidas de pupas extraídas de frutos maduros (alimentadas y no alimentadas) lo hicieron. Con respecto a las que volaron, se observó que las hembras no alimentadas realizaron más vuelos en comparación con las alimentadas (Chisq= -2.00; df=1; p=0.04); el 70% de las hembras

no alimentadas realizaron más de un vuelo en comparación con el 40% de hembras que se alimentaron. También se observó que en ambos grupos la proporción de hembras que volaron disminuyó conforme transcurrió el experimento; todavía hasta el sexto día de pruebas consecutivas se observó que una pequeña fracción de hembras pudo volar (Fig. 3).

Discusión

El presente estudio sobre la actividad estacional del vuelo y estado de apareamiento de las hembras colonizadoras de *H. hampei* durante el periodo inter cosecha, ha permitido confirmar y precisar información proveniente de la literatura. Por ejemplo, se comprobó que la emergencia masiva de la broca ocurre en esta época y es motivada por las lluvias esporádicas e intensas (40-55 mm/semana) que se presentan entre marzo y abril en la región del Soconusco, como lo señalan las investigaciones realizadas en esta región (Baker 1984, Baker et al. 1992, Baker y Barrera 1993, Barrera 1994). Las brocas que emergieron masivamente de los frutos residuales respondieron fuertemente al atrayente de metanol-etanol contenido en las trampas, lo que también permite confirmar que el trampeo es una herramienta muy útil en monitoreo y control de esta plaga (Barrera et al. 2005, 2006, Dufour et al. 2007).

Asimismo, el análisis de la espermateca proporcionó datos objetivos que confirman la información proveniente de literatura antigua (p.e. Bergamin 1943, Ticheler 1961), que sugería que las hembras colonizadoras habían sido inseminadas antes de emerger del fruto donde se desarrollaron. En efecto, nuestro estudio mostró que todas las hembras examinadas que fueron capturadas en las trampas, tenían espermatozoides en sus espermatecas; es decir, en las muestras revisadas no se encontraron hembras vírgenes. Una revisión más detallada mostró que la gran mayoría (98.4%) de estas hembras había sido inseminada recientemente (espermateca llena de espermatozoides), lo cual sugiere que los machos –sus hermanos de alas atrofiadas– se habían apareado con ellas antes de abandonar el fruto natal; también sugiere que, estas hembras están presentes al iniciar nuevas colonias en los frutos de la cosecha que inicia su formación, y que ha motivado a designarlas como hembras colonizadoras (Bergamin 1943; Giordanengo 1992, Mathieu et al. 1997). Al comparar las tasas de inseminación del periodo abril a junio de 2014 con

el periodo febrero a abril de 2015, se observó que sus valores fueron bastante estables en el tiempo. Este resultado refuerza la hipótesis de que la inseminación es una característica intrínseca de las hembras colonizadoras, la cual está asociada a su capacidad de vuelo, característica que les permite colonizar eficientemente nuevos frutos de café. Por otro lado, si las hembras colonizadoras se han apareado con sus hermanos, aún queda por explicar el mecanismo utilizado por *H. hampei* para superar el posible problema que conlleva la endogamia.

Las hembras colonizadoras de *H. hampei* son aptas para el vuelo porque sus músculos alares están completamente desarrollados; sin embargo, una vez que éstas se establecen en un fruto de café pierden la capacidad de volar porque la energía contenida en los músculos alares es re-dirigida por el insecto hacia la maduración de los huevos, como sucede en otros escolitinos (Ticheler 1961, López-Guillen et al. 2011). Las pruebas de vuelo que realizamos con hembras colonizadoras con y sin alimento confirman estos resultados, aunque la pérdida de la capacidad de vuelo fue más bien un proceso paulatino, lo que eventualmente permitiría que las hembras colonizadoras realicen un segundo vuelo en caso que los frutos hospederos no sean adecuados para su multiplicación. Este es un hallazgo importante de nuestra investigación porque la realización de un segundo vuelo supone mejorar la sobrevivencia y tener mayor éxito en la dispersión de la especie. Dado que en nuestro estudio las hembras vírgenes (con o sin alimento) no volaron ni intentaron volar –observaciones similares a las reportadas por Giordanengo (1992)–, es posible que la inseminación de las hembras antes de abandonar el fruto natal sea condición necesaria para adquirir el estado de colonizadoras.

En conclusión, las hembras de *H. hampei* que han iniciado el proceso de dispersión a partir de abandonar los frutos residuales natales durante el periodo inter cosecha, son capaces de volar y se encuentran inseminadas, lo que asegura el inicio de la oviposición y de una nueva generación si encuentran el hospedero adecuado. En el marco del manejo integrado de la broca, la destrucción de los frutos residuales, la captura de las hembras colonizadoras con trampas y la cosecha completa y el trampeo de las hembras colonizadoras, son actividades esenciales que pueden frenar la sobrevivencia y la dispersión de esta plaga.

Agradecimientos

Agradecemos a Enrique López, Javier Valle-Mora, Dulce Thelma Gonzalez-Castillo y Maria de los Angeles Palomeque-Rodas de ECOSUR, por su apoyo técnico. Finalmente, agradecemos al *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD), al the *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado como beca doctoral de A.K.R.R., número de beca 777606C y 293465, respectivamente.

Literatura citada

- Baker PS. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomologica Mexicana* 61: 9-24.
- Baker PS, Ley C, Balbuena R, Barrera JF. 1992. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* 82: 145-150.
- Baker PS, Barrera JF. 1993. A field study of a population of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), in Chiapas, México. *Tropical Agriculture* 70: 351-355.
- Barrera JF. 1994. Dynamique des populations du scolyte des fruits du caféier, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), et lutte biologique avec le parasitoïde *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae), au Chiapas, Mexique. Tesis. Université Paul Sabatier, Toulouse, Francia, 301 pp.
- Barrera JF, Herrera J, Valle J. 2005. Efecto de la altura de la trampa en la captura de la broca del café: implicaciones en dispersión y muestreo. *Entomología Mexicana* 4: 542-546.
- Barrera JF, Herrera J, Villacorta A, García H, Cruz L. 2006. Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*, pp. 71–83. In J. F. Barrera, and P. Montoya (eds.), *Simposio sobre Trampas y Atrayentes en Detección, Monitoreo y Control de Plagas de Importancia Económica*. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur, Manzanillo, Colima, México, 2006.

- Bergamin J. 1943. Contribucao para o conhecimento da biología da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col: Ipidae). Archives of the Institute of Biology 14: 31–72.
- Brun LO, Borsa P, Gaudichon V, Stuart JJ, Aronstein K, Cousta C, French-Constant RH. 1995. Functional haplodiploidy. Nature. 374: 506.
- Damon A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research 90: 453–465.
- Dufour BP, Franco-Franco F, Hernández A. 2007. Evaluación del trapeo en el marco del manejo integrado de la broca del café, 89-99. In: J.F. Barrera, A. García, V. Domínguez and C. Luna (eds.), *Memoria: La Broca del Café en América Tropical: Hallazgos y Enfoques, Workshop Internacional*, ECOSUR and Sociedad Mexicana de Entomología, México.
- Giordanengo P. 1992. Biologie, éco-ethologie et dynamique des populations de Scolyte des grains de café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera, Scolytidae), en Nouvelle-Calédonie. Mémoire de thèse de doctorat, Univers. Rennes I. France.
- Le Pelley RH 1968. Pests of Coffee, Longmans, Green and Co., Ltd. ed. London.
- López A 1993. Contribution à la biologie du scolyte du café (*Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae). Mémoire de DEA, Université Paris XIII, France.
- López-Guillén G, Valdez-Carrasco J, Cruz-López L, Barrera JF, Malo EA, Rojas JC. 2011. Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. Environmental Entomology 40: 441-448.
- Köppen W. 1918. Klassifikation der Klimate nach Temperatur, Niederschlag und Jahreslauf. Petermanns Mitteilungen 64: 193-203.
- Mathieu F, Brun LO, Frérot B. 1997. Factors related to native host abandonment by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomology 121:175–180.
- Román-Ruiz AK, Michel B, Dufour BP, Rojas JC, Cruz-López L, Barrera JF. 2017. Description of the sperm and spermatheca of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) for the differentiation of mated and unmated

females. *Annals of the Entomological Society of America* 1:7, doi: 10.1093/aesa/sax033.

Silva WD, Moreira CC, Bento JMS. 2014. How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit?. *Journal of Insect Behavioral* 27: 729-735.

Ticheler J. 1961. Etude analytique de l'épidémiologie du scolyte des graines de café, *Stephanoderes hampei* Ferr.en Côte d'Ivoire. *Landbouwhogeschool, Wageningen* 61: 1–49.

Waterhouse DF, Norris KR. 1989. Biological control Pacific Prospects-Supplement 1. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra, Australia.

Cuadro 1. Criterios para reconocer el estado de apareamiento de hembras adultas de *H. hampei*.

Característica	Hembras vírgenes	Hembras jóvenes apareadas*	Hembras viejas apareadas**
Intensidad de la coloración cuticular de la espermateca con Giemsa	Clara	Obscura	Obscura
Delimitación de las paredes de la cutícula de la espermateca (canal)	Indefinida	Definida	Definida
Forma del abdomen	No abultada	Abultada	Abultada
Espermatozoides en la espermateca	Ausentes	Presentes *(espermateca completamente llena)	Presentes **(espermateca casi vacía) o ausentes (los espermatozoides migraron hacia la glándula espermática)

* Hembras apareadas que aún no han realizado la fecundación de los huevos.

** Hembras que no realizaron el proceso de fecundación y, en consecuencia, la espermateca esta vacía.

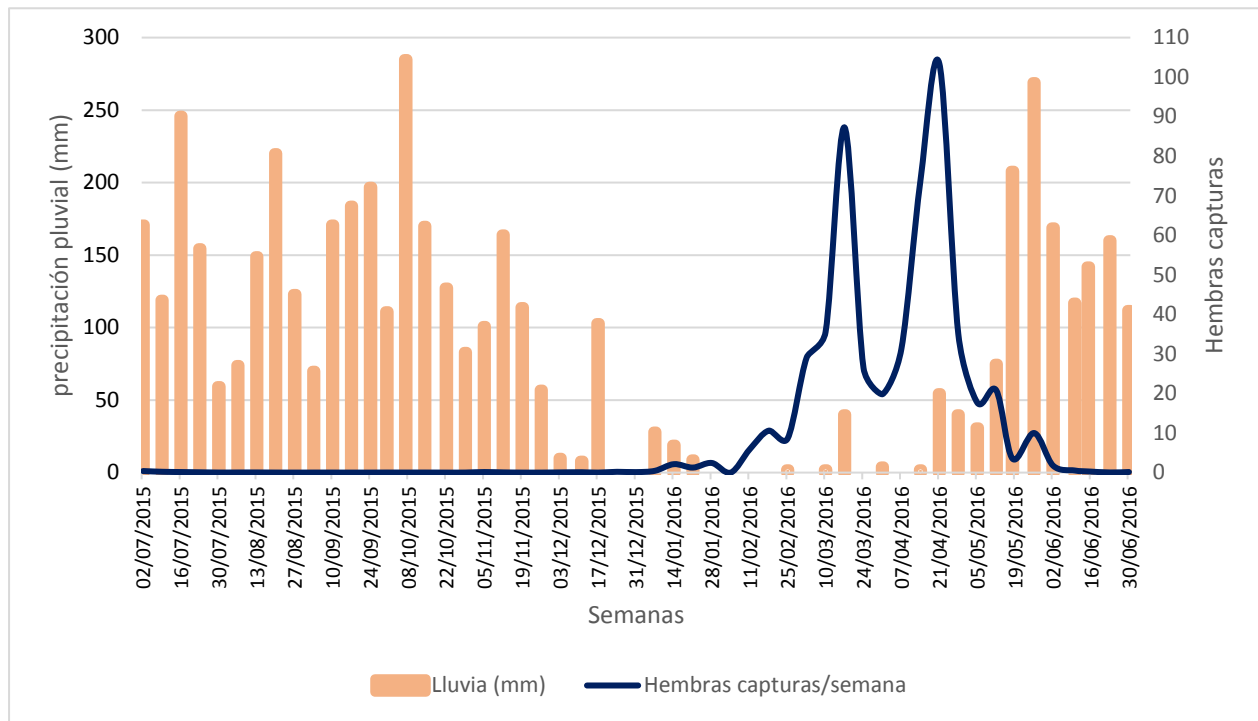
Cuadro 2. Estado de apareamiento de hembras colonizadoras de *H. hampei* capturadas con trampas.

Fecha	Muestra de hembras examinadas	Inseminación reciente			Inseminación vieja			Sin inseminación		
		No. por muestra	% por muestra	% por año	No. por muestra	% por muestra	% por año	No. por muestra	% por muestra	% por año
Abr, 2014	72	71	98.6		1	1.4		0	0	
May, 2014	176	172	97.7	98.2	4	2.3	1.8	0	0	0
Jun, 2014	92	91	98.9		1	1.1		0	0	
Feb, 2015	50	48	96		2	4		0	0	
Mar, 2015	50	50	100	98.7	0	0	1.3	0	0	0
Abr, 2015	50	50	100		0	0		0	0	
Total	490	482	98.4		8	1.6		0	0	

Cuadro 3. Estado de apareamiento de hembras de *H. hampei* extraídas manualmente de frutos residuales.

Fecha	Muestra de hembras examinadas	Inseminación reciente		Inseminación vieja		Sin inseminación	
		No.	%	No.	%	No.	%
Feb 2016	50	31	62	9	18	10	20
Mar 2016	50	48	96	1	2	1	2
Abr 2016	50	45	90	0	0	5	10
May 2016	50	45	90	0	0	5	10
Total	200	169	84.5	10	5	21	10.5

a



b

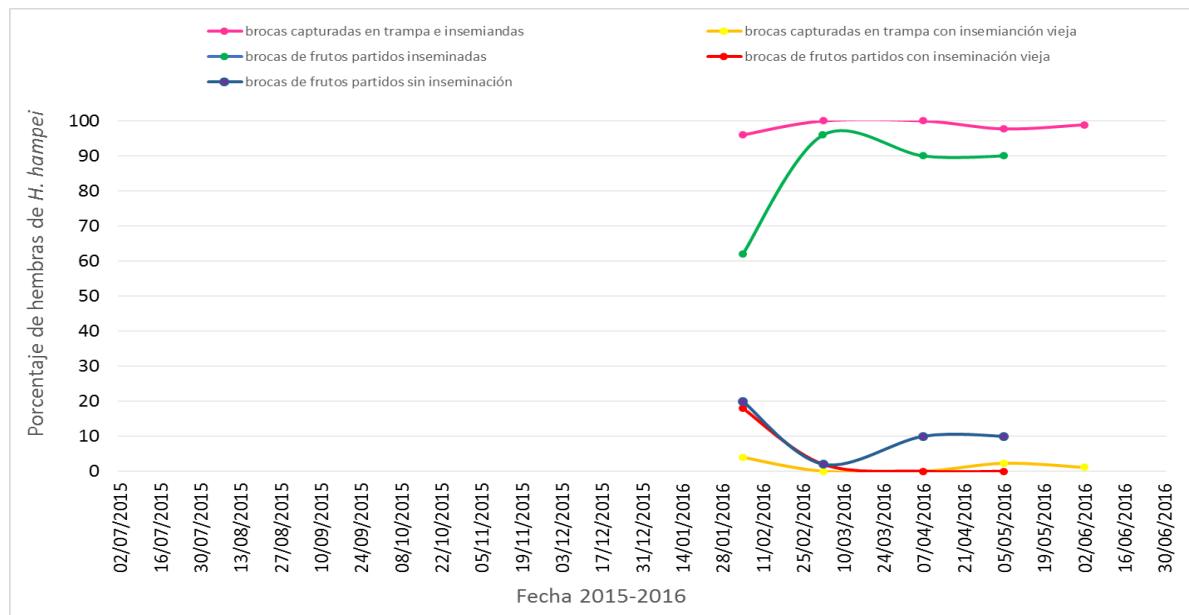
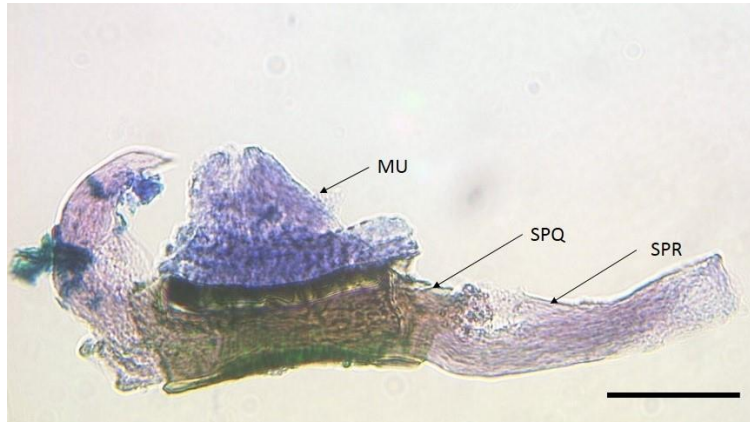


Fig. 1. Actividad estacional del vuelo de hembras colonizadoras de *H. hampei* (a) y estado de apareamiento (b) en finca “La Alianza”, Cacahoatán, Chiapas.

A



B

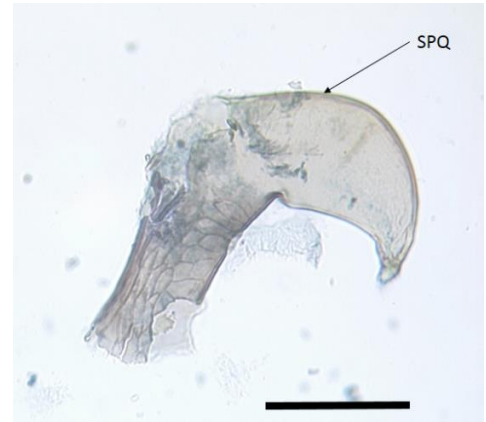


Fig. 2. a. Spermatheca de hembra colonizadora de *H. hampei*, partida y teñida con Giemsa. (MU) músculo espermático; (SPQ) espermateca; (SPR) espermatozoides. Barra de escala = 100 μ m. b. Spermatheca de hembra vírgen de *H. hampei* female, partida y teñida con Giemsa. (SPQ) espermateca. Barra de escala = 100 μ m.

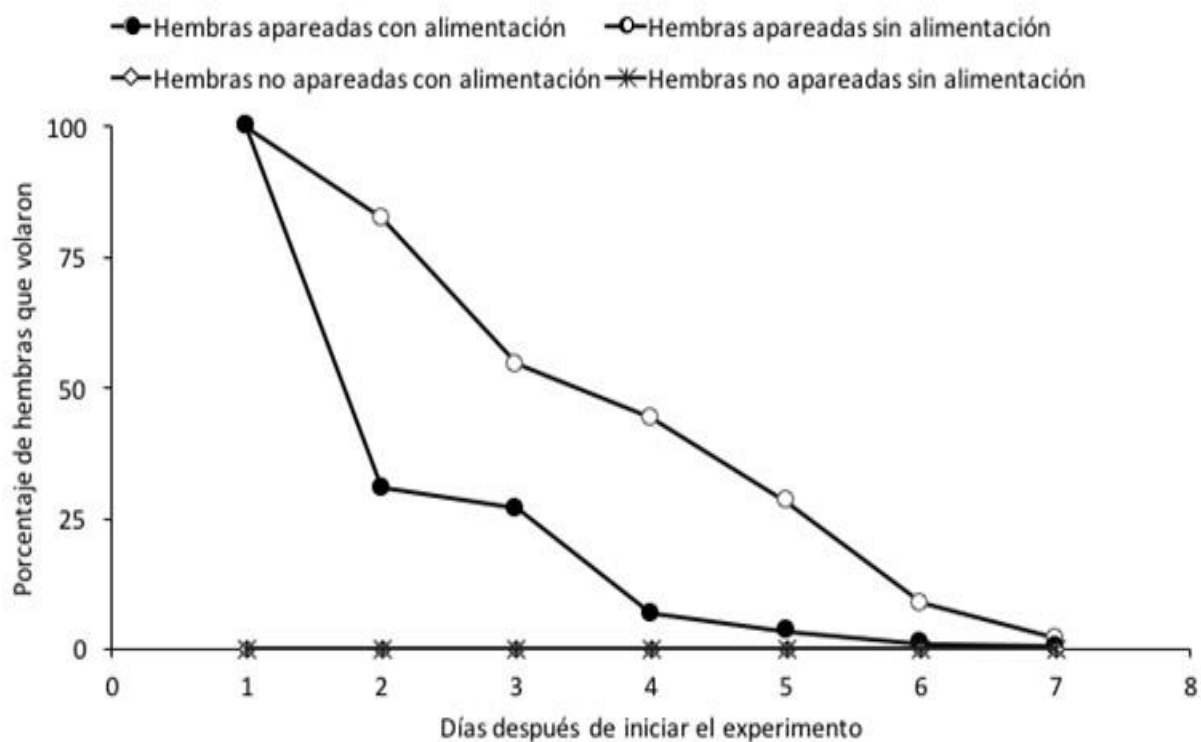


Fig. 3. Efecto de la alimentación sobre el vuelo de hembras de *H. hampei* obtenidas mediante inducción de la emergencia de frutos residuales (hembras apareadas) y hembras obtenidas de pupas extraídas de frutos maduros de café (hembras no apareadas o vírgenes).

3.2. Efecto de los sustratos alternos como refugios temporales y humedad en la sobrevivencia de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae).

Resumen

La broca del café (*Hypothenemus hampei*) es una plaga importante de la cafeticultura. En el periodo inter cosecha, los frutos de café infestados no cosechados caen al suelo, las brocas que ahí se encuentran emergen, y una fracción de estas se congregan en los frutos residuales de ramas. El resto queda expuesta a las condiciones del medio (lluvias y ausencia de hospederos viables). En este trabajo se estudió la capacidad de las hembras colonizadoras de *H. hampei* de usar refugios temporales y sobrevivir en ambientes secos y mojados. Pruebas bajo condiciones de laboratorio fueron realizadas con ocho refugios potenciales y, cinco tratamientos correspondientes a ambientes secos y mojados fueron evaluados bajo condiciones controladas y de campo. Los resultados obtenidos indicaron que las hembras sobreviven hasta 16 días en refugios temporales, siendo *Ricinus communis*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria maypurensis* y pedúnculo de *Coffea* spp. También, las hembras sobrevivieron de siete a 10 días en ambientes secos expuestos en laboratorio y en ambientes mojados expuestos en campo; aunado, sobrevivieron hasta 20 días en ambientes mojados bajo condiciones de laboratorio.

Palabras clave: Broca del café, mortalidad, humedad, refugio.

Introducción

En México y Centroamérica, el ciclo fenológico del cafeto (floración y fructificación) esta influenciado por la marcada alternancia de las estaciones secas y lluviosas, por lo que la producción conduce a una cosecha anual única (Dufour et al. 1999). En el periodo intercosecha, la disminución de la disponibilidad de frutos en estado de crecimiento propicia que el proceso de desarrollo de la broca se detenga. Por otro lado, una parte coincide con el final de la época seca, difícil y agotadora para la broca que está acostumbrada a vivir en un ambiente húmedo balanceado (Ticheler 1961). Sin embargo, la broca que sobrevive en estas condiciones, permanece en los frutos llamados “residuales” generalmente secos, algunos en las ramas y otros dispersos en el suelo (Mathieu et al. 1997; Dufour et al. 2007). Las primeras olas de hembras colonizadoras están relacionadas con su emergencia de frutos del suelo, a menudo ocurre en cantidades considerable y bajo la influencia de lluvias dispersas (Baker 1984; Baker et al. 1992; Dufour et al. 2000). Pero ¿Qué sucede con miles y millones de hembras que vuelan cuando no hay hospederos disponibles en los cafetales y mucho menos fuera de los límites del cultivo? De la sobrevivencia de la broca después de su dispersión, poco se sabe. Sin embargo, fue observado que una fracción de colonizadoras logra refugiarse en los frutos residuales secos de las ramas (Mathieu et al. 1997; Dufour et al. 2007). Ahí permanecen temporalmente, en espera que las condiciones del medio sean favorables para colonizar frutos de la nueva generación. Así, en estos refugios inviables para la alimentación y desarrollo, se presume que las hembras entran en un proceso de diapausa reproductiva (Mansingh 1991, Barrera et al. 2005) lo que Mathieu (1997) llama “momentary interruption in development”.

Se sabe que *H. hampei* es atraída a los frutos de café donde se alimenta, donde se refugia y continua su ciclo, pero también, varios autores han observado esta especie en otras plantas, lo que valida su comportamiento alimenticio polífago. En su ficha técnica sobre la broca del café, Barrera (2012) presenta una lista bibliográfica de plantas hospederas primarias (indispensables para la alimentación y la reproducción) y hospederas alternas (usadas como alimento o escondrijo temporal de la broca del café) a la cual se puede agregar la nuez de Pará (*Bertholletia excelsa* Lecythidaceae) en Brasil (Gumier-Costa 2009). Estos sustratos alternos podrían entonces representar una

segunda alternativa de sobrevivencia para la broca en las condiciones drásticas de la inter cosecha.

En este estudio, prestamos más atención a la sobrevivencia de las hembras colonizadoras sobre plantas que sirven de refugio temporal, limitándonos a algunos recursos alimentarios encontrados en el cafetal, especialmente semillas, vainas y otros órganos para determinar la aptitud de la broca a desarrollarse sobre estos medios, y en caso contrario, comprobar su capacidad de sobrevivencia adentro o afuera de estos recursos, como refugios temporales. También, nos enfocamos en el rol de los factores ambientales, tales como la temperatura, el grado de humedad y la lluvia. Así, la interacción de estos últimos factores con los recursos alimentarios, ¿Se puede establecer soluciones viables para que las poblaciones de broca colonizadora puedan sobrevivir en periodo de inter cosecha?

Materiales y Métodos

Material biológico.

Las hembras colonizadoras de broca utilizadas en este estudio, provinieron de frutos residuales de café (*C. canephora*) colectados en las fincas “La Alianza” y “La Concepción”, en Cacachoatán, Chiapas, México, durante el periodo inter cosecha (febrero-mayo 2015 y 2016). Estos frutos fueron almacenados en recipientes de plástico (30 cm de diámetro x 12 cm de alto), a 26-28°C y 70-80% HR, hasta su utilización en cámaras de emergencia.

Inducción de la emergencia de hembras colonizadoras.

Para inducir la emergencia de las hembras, los frutos se sumergieron en agua durante 15 s, se secaron con papel toalla, luego se depositaron en el interior de una cámara de emergencia (ver sección 2.2).

Sobrevivencia en refugios temporales.

Suelo y partes de plantas comunes en plantaciones de café se colectaron para probar su potencial como refugios temporales de las hembras colonizadoras de *H. hampei*. Tras

pruebas rápidas se eligieron ocho partes de plantas (Cuadro 1, Fig. 1), y se eliminaron el suelo y semillas de *Delonix regia* e *Inga spuria* porque en pruebas preliminares la broca no las perforó. Las partes de plantas elegidas, colectadas de campo 4 h antes de iniciar el experimento, se colocaron en frascos de polietileno de 23 ml de capacidad con los extremos cubiertos con organza y en seguida se introdujeron 20 hembras de *H. hampei* recién emergidas. En total se prepararon 10 repeticiones por cada tipo de parte de planta evaluada. Un frasco sin muestra y con un grupo de 20 hembras de *H. hampei*, con condiciones similares a los otros tratamientos, fue utilizado como control. Los frascos se colocaron sobre una zaranda y ésta se introdujo a una cámara húmeda (72.5 cm de largo x 31.5 cm de ancho x 27.5 cm de alto) cuyas dos paredes más largas tenían ventanas de aireación (43 cm de largo x 13.5 cm de ancho) cubiertas con organza; para generar un alto y constante nivel de humedad relativa, dos recipientes de plástico (20 cm de diámetro y 8.5 cm de alto) con agua se colocaron debajo de la zaranda (Fig. 2). Este dispositivo se colocó en un cuarto con condiciones controladas (26 ± 2 °C, 60-80% HR, 14 h luz y 8 h obscuridad) y diariamente se registró el número de hembras vivas en cada uno de los ocho tratamientos, las cuales se reconocieron porque producían residuos (polvo) al perforar las partes vegetativas evaluadas. Las hembras muertas se colocaron individualmente en capsulas vegetales ("O" empty capsule #1) durante dos días, para confirmar la muerte; en caso de mostrar movimiento, éstas se regresaban al frasco experimental correspondiente para continuar con el estudio. Los insectos que escaparon durante las observaciones se descartaron del experimento. Cabe mencionar que se determinó el porcentaje de humedad relativa inicial de los sustratos evaluados.

Sobrevivencia en ambientes húmedos

Para evaluar la sobrevivencia de las hembras colonizadoras con respecto a la presencia (ambiente mojado) o ausencia (ambiente seco) de agua (estado líquido), se diseñó un experimento bajo dos condiciones ambientales (interior y exterior del laboratorio de Control Biológico de El Colegio de la Frontera Sur ubicado en Tapachula, Chiapas), y en cada una se colocaron brocas contenidas en frascos con la pared interna seca o mojada. De esta manera, se tuvieron los siguientes cuatro tratamientos: i) Ambiente interior de laboratorio con frascos con paredes mojadas, ii) Ambiente interior de laboratorio con

frascos con paredes secas, iii) Ambiente exterior de laboratorio con frascos con paredes mojadas, y iv) Ambiente exterior de laboratorio con frascos con paredes secas (Cuadro 2). Se usaron 19 y 13 frascos de plástico de 23 ml de capacidad con ambos extremos cubiertos con tela organza por ambiente interior y exterior de laboratorio, respectivamente. En cada frasco se introdujeron 20 hembras colonizadoras recién emergidas. En los tratamientos con paredes mojadas, antes de introducir los insectos a los frascos, las paredes internas se mojaron con una leve pulverización de agua (aprox. 2 ml) con un aspersor manual de 500 ml de capacidad y la pulverización del agua se repitió tres veces al día hasta la muerte de los insectos. Los frascos mojados y secos en el ambiente interior de laboratorio se colocaron dentro de una cámara húmeda cuyos datos de humedad se presentan en la figura 3, mientras que aquellos colocados en el ambiente exterior de laboratorio se expusieron al aire libre sobre una zaranda puesta a 13 cm sobre el suelo y resguardados de los rayos directos del sol. Un lote de 25 cajas de Petri (60 X 15 mm) con 25 brocas cada una, en seco, cubiertas con papel aluminio según recomendaciones de Silva et al. (2014), se colocaron bajo condiciones de temperatura y humedad del laboratorio (Fig. 3). Este lote desempeña el papel de control.

Diariamente, con la ayuda de una lupa (10X), se contabilizó el número de hembras vivas; las brocas que parecían muertas se colocaron individualmente en capsulas vegetales ("O" empty capsule #1) y se observaron durante dos días para confirmar la muerte y en caso de continuar vivas se regresaron al frasco experimental. Asimismo, todos los días se registró la temperatura y humedad relativa durante el tiempo que duró el experimento (mayo de 2015) (Fig. 3).

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con una prueba de Log-Rank k-muestras asintóticas y con una prueba de Tukey para comparación de variables múltiples con corrección de Bonferroni. Los análisis se realizaron con el paquete R v 3.0.0.

Resultados

*Sobrevivencia de hembras de *H. hampei* expuestas a diferentes sustratos.*

La sobrevivencia de las hembras colonizadoras de *H. hampei* estuvo relacionada con el tipo de sustrato evaluado ($\chi^2=46$; $df=8$; $p=2.42e-07$). Las hembras colonizadoras de *H. hampei* sobrevivieron mayor tiempo en sustratos alternos en comparación con su hospedero y el control. Más del 80% de las hembras evaluadas sobrevivieron de 0-5 días en su hospedero *C. canephora* (CA) y ramas de *Coffea* spp. (R), en comparación con el pedúnculo de *Coffea* spp (P) y *Ricinus communis* (HI) donde menos del 56% de hembras sobrevivieron en este rango (Cuadro 3). Al cabo de 6 a 10 días, la disminución de la sobrevivencia fue más evidente en CA (9.17%), R (16.56%), sin sustrato (SS) (17.07%), pero entre el 22-42% de las hembras correspondientes a los tratamientos P, AR (*Cajanus cajan*), HI, CP (*Crotalaria maypurensis*), HO (Hojarasca de *Coffea* spp) y TE (*Nectandra* spp.), se mantuvieron con vida durante este periodo. Únicamente, aquellas hembras que se encontraron en los sustratos HI, CP, P, AR, lograron sobrevivir más de 15 días. Pero en el caso de AR y P, las hembras sobrevivieron de 3 a 4 días más en comparación con C, HO y R (Cuadro 3, Fig. 4). Asimismo, se encontró que un mayor porcentaje de hembras de *H. hampei* sobreviven más días en HI, en comparación con el resto de sustratos evaluados (Cuadro 3), y que las hembras de *H. hampei* pueden sobrevivir sin alimento hasta 15 días, bajo condiciones de laboratorio; pero, el mayor porcentaje de sobrevivencia se observó durante los primeros cinco días de la emergencia. Al comparar los tratamientos, se encontraron diferencias significativas cuando HI fue comparada con el resto de los sustratos ($\alpha>0.01$). A su vez, la sobrevivencia de las hembras evaluadas con AR y P fueron significativamente diferentes con respecto al SS, así como P con respecto a CA (0.0497) y HO ($\alpha >0.001$) (Cuadro 4).

En cuanto a las barrenaciones que realizó *H. hampei* a los sustratos, AR, CA, CP, HI y TE presentaron orificios de penetración realizados por las hembras, así como profundas barrenaciones generando polvo cuando penetraron en el endospermo de las vainas o de los frutos. El número de barrenaciones varió de 1 a 2 en las semillas de AR y CP y, de 2 a 4 en la semilla de HI. No todos los orificios generaron barrenaciones. En el caso de CA, se encontraron indicios de barrenación con un promedio de tres por fruto, y en algunos casos se hallaron brocas muertas en el endospermo del fruto, pero ninguna prueba de oviposición. En el caso de los tratamientos P y R, las hembras solamente se refugiaron en el interior de orificios o ranuras que estos sustratos presentaron desde el

inicio de la evaluación. En hojarascas (HO), las hembras se refugian y aglomeran entre las hojas.

Por otro lado, la humedad relativa que presentaron los refugios temporales al inicio de la evaluación fue variable. Las muestras de R, HI y CA presentaron más del 80% de humedad relativa, en comparación con AR, CP y P que contenían entre 60-73%. En cambio, HO (47.23%) y TE (25.28%) fueron las muestras que presentaron menor humedad relativa al inicio de la evaluación (Cuadro 3). El porcentaje de humedad final de los refugios temporales disminuyó gradualmente durante la evaluación.

*Sobrevivencia de hembras de *H. hampei* en ambientes secos y mojados*

Los resultados obtenidos indican que la mayoría de las hembras de *H. hampei* evaluadas, sobreviven de ocho a 20 días según el tratamiento evaluado (Figura 5). Durante los primeros cinco días, se observó que un mayor número de hembras sobrevivieron en condición de paredes secas y ambiente húmedo (LaD+W y GaD+W). Pero, a los 10 días, la tendencia se invierte con respecto a los otros tratamientos. Al final, las hembras en recipientes con paredes mojadas y ambiente húmedo en condiciones de laboratorio (LaW+W) sobrevivieron hasta 20 días, y las hembras de los otros tratamientos hasta 15 días (Cuadro 5 y Figura 5). Aunado a esto, en los recipientes con paredes mojadas, el 40% de hembras quedaron pegadas por las alas membranosas y un 10% por los élitros. Se encontró que estos correspondían a las hembras muertas contabilizadas durante el día de observación.

Al comparar todos los tratamientos, se encontró diferencia en la sobrevivencia de las hembras evaluadas ($\chi^2=55.72$, $g_L=4$, $p\text{-value}=2.29e-11$). El tratamiento “paredes mojadas” bajo condiciones de laboratorio (LaW+W) fue significativamente diferente de los tratamientos “paredes secas” en laboratorio y afuera (LaD+W y GaD+W). El tratamiento (GaW+W) y el control (LaD+D) fueron diferentes a los tratamientos con paredes secas (LaD+W y GaD+W) (Cuadro 6).

Discusión

Las hembras colonizadoras de *H. hampei* expuestas en condiciones de temperatura y humedad favorables a su desarrollo ($T = 26 \pm 2^\circ\text{C}$; $HR = 60\text{-}80\%$) presentaron diferencias

en el tiempo que sobrevivieron en los sustratos diferentes a los frutos de café, seleccionados para este experimento. No obstante, se observó que la broca no barrenó en todos los refugios y no se observaron rastros de alimentación, como ocurrió con *Nectandra* spp (T) que presentó baja humedad relativa, pedúnculo con 96.69% de humedad, mayor al resto de los sustratos evaluados, y ramas con 73.37%. En cuanto a la sobrevivencia, la mayor tasa observada ocurrió a los 10 días donde alcanzó el 42% y no sobrepasó el 10.84% a los 15 días, y el 7.83% a los 20 días de evaluación, lo que coincide con un estudio previo en donde se menciona que, la broca del café que recién abandonan a los frutos residuales son capaces de sobrevivir 11 días sin alimento y bajo condiciones de laboratorio (Baker 1984).

Estos resultados complementan la lista bibliográfica de Barrera (2012), sobre las posibles plantas hospederas primarias de *H. hampei* como recurso para la alimentación y reproducción, y hospederas alternas que se usan como alimento o refugio temporal. En este estudio, ningún rastro de oviposición o desarrollo de *H. hampei* fue detectado en los refugios evaluados, lo que sugiere que en condiciones experimentales, no existe ciclo intermedio que podría permitir a la broca reproducirse antes de colonizar los frutos de café, aunque *Cajanus cajan* probado aquí, fue reconocido como huésped primario (Campos-Almengor 1981). Entre los sustratos que no fueron perforados por la broca, la nuez de *Nectandra* spp., se caracterizó por tener una tasa de hidratación muy baja en comparación con los otros frutos (Cuadro 3). Incluso algunas cerezas de café que tuvieron un porcentaje de hidratación menor del 80%, no permiten la sobrevivencia normal de la broca, así como su desarrollo (Ticheler 1961). Así pues, en condiciones óptimas de temperatura, humedad relativa e hidratación del sustrato, la sobrevivencia no excedió 16 días para *R. communis* y 15 días para *C. cajan*, pedúnculo de *Coffea* spp y *C. maypurensis* (Cuadro 3).

Esta lapso de tiempo es demasiado corta para que una amplia proporción de hembras colonizadoras puedan alcanzar las primeras cerezas de café de la nueva fructificación, en particular, las cohortes que corresponden a los grandes picos de dispersión tras las primeras lluvias del final de la temporada seca. Según Dufour et al. (2000) esta cantidad destinada a morir en el campo, sobrepasaría 90%. Por otro lado, se ha demostrado que después de realizar una cosecha sanitaria estricta a nivel de las

ramas, que consiste en eliminar todos los frutos residuales que pueden servir de refugio a las hembras colonizadoras dispersándose, el nivel de infestación en la nueva fructificación bajaría considerablemente (Dufour et al. 2007). Este resultado indica que, a excepción de estos frutos donde la broca puede sobrevivir varios días, existen muy pocos refugios capaces de mantener la broca viva por tanto tiempo. Por lo que este comportamiento, es una estrategia para garantizar que, cuando se presenten las condiciones que induzcan la dispersión, estas vuelen hacia nuevos sitios de colonización.

*Sobrevivencia de hembras de *H. hampei* en ambientes mojados*

Aun con la probable heterogeneidad en la edad y condición fisiológica de las hembras de *H. hampei* evaluadas (Damon 2000; López-Guillén et al. 2011; Silva et al. 2014), los resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio y campo simulado, indican que la sobrevivencia de las hembras colonizadoras de *H. hampei* varía según las condiciones ambientales en las que se encuentran. Cuando las hembras de *H. hampei* se expusieron a condiciones mojadas, un bajo porcentaje sobrevivió de siete a 20 días (Figura 5). Es posible que, los insectos tratados en ambientes mojados consuman una parte del agua disponible en el contenedor, lo que hace que estos puedan sobrevivir más que sus conespecíficos que presentaron condiciones secas (LaD+W, GaD+W y LaD+D), los cuales sobrevivieron de dos a siete días (Figura 5). Se ha reportado que en algunos insectos, los adultos de holometábolos “beben” agua de forma directa o la obtienen de su ambiente, el cual es vital para que realicen los procesos metabólicos y continúen con su ciclo (Parra 2012; Douglas 2013). No obstante, el grado de tolerancia de pérdida de agua por acción de dichos procesos varía con respecto a la especie, pero finalmente, el insecto muere (Dow 2013). Cabe mencionar que, en los tratamientos de ambientes mojadas, se observaron alas membranosas y élitros pegados en las paredes del contenedor. Es probable que, cuando las hembras intentaron volar y las alas se pegaron al contenedor, el gasto de energía realizado para desprenderse y el daño ocasionado al desprenderse las alas, disminuyeron el tiempo de sobrevivencia.

Durante los periodos de sequías prolongadas, la sensibilidad que presenta *H. hampei* hacia los cambios en la humedad del ambiente, genera una disminución en la infestación de su hospedero (Baker et al. 1994). Pero, en este trabajo también

encontramos que cuando el insecto se desarrolla en un ambiente seco (LaD+W, GaD+W y LaD+D), el tiempo de sobrevivencia de la broca se reduce. Entonces, es probable que para sobrevivir a la desecación del periodo inter cosecha, las hembras de broca se agrupan en el interior de frutos residuales o remanentes en ramas y suelo.

Finalmente, la utilización de diferentes sustratos y la influencia de la humedad en la sobrevivencia de los insectos, se ha observado en otros insectos fitófagos, ya que atraviesan parches del hábitat o sitios de forrajeos para localizar sitios de alimentación, refugio, apareamiento y oviposición (Hanski, 1999; Noriyuki, 2015). En este sentido, durante dicho desplazamiento, en conjunto con condiciones ambientales adversas, la presencia de otras plantas y recursos, son factores importantes para que los insectos sobrevivan y se refugien mientras localizan a su hospedero viable. No obstante, es necesario realizar más estudios con *H. hampei* en campo para conocer su comportamiento natural. Así, este estudio contribuirá en los estudios de dispersión espacio-temporal de la broca del café y mejorará la implementación del manejo integrado de la broca.

Agradecimientos

Agradecemos a Enrique López, Javier Valle-Mora, Dulce Thelma Gonzalez-Castillo y Maria de los Angeles Palomeque-Rodas de ECOSUR, por su apoyo técnico. Finalmente, agradecemos al *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD), al *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado como beca doctoral de A.K.R.R., número de beca 777606C y 293465, respectivamente.

Literatura citada

- Baker PS. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomologica Mexicana* 61: 9-24.
- Baker PS, Ley C, Balbuena R, Barrera JF. 1992. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* 82: 145-150.
- Baker PS, Rivas A, Balbuena R, Ley C, Barrera JF. 1994. Abiotic mortality factors of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71: 201-209.
- Barrera JF. 2012. Ficha técnica broca del café *Hypothenemus hampei*. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica), México, D.F., 38 p.
- Barrera JF, Herrera J, Valle J. 2005. Efecto de la altura de la trampa en la captura de la broca del café: implicaciones en dispersión y muestreo. *Entomologica Mexicana* 4: 542-546.
- Campos-Almengor O. 1981. El gandul *Cajanus cajan* como hospedero de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) en Guatemala. In: IV Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, Guatemala, Guatemala, p. 155-159.
- Damon A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research* 90: 453-465.
- Douglas AE. 2013. Alimentary canal, digestion and absorption. In: Simpson SJ, Douglas AE. Eds. *The Insect Structure and function* (5th edition). Cambridge University Press. Pp. 46-80.
- Dow JAT. 2013. Excretion and salt and water regulation. In: Simpson SJ, Douglas AE. Eds. *The Insect Structure and function* (5th edition). Cambridge University Press. Pp. 546-587.

- Dufour B, Barrera JF, Decazy F. 1999. La broca de los frutos del cafeto: ¿La lucha biológica como solución?. In Bertrand B, Rapidel B. Eds. Desafíos de la cafeticultura en Centroamérica, San José Costa Rica. CIRAD, IICA. Pp.293-325.
- Dufour B, Gonzalez MO, Frerot B. 2000. Piégeage de masse du scolyte du café *Hypothenemus hampei* Ferr. (Col. Scolytidae) en conditions réelles: Premiers résultats. XVIII Colloque ASIC 1999, Helsinki, Finlande.
- Dufour BP, Franco Franco F, Hernández A, 2007. Evaluación del trapeo en el marco del manejo integrado de la broca del café. In Barrera JF, García A, Domínguez V, Luna C. Eds. La Broca del Café en América Tropical: Hallazgos y Enfoques, Workshop Internacional, Junio 2007, Acapulco, Guerrero, México. El Colegio de la Frontera Sur y Sociedad Mexicana de Entomología., México. Pp. 89-99.
- Gumier-Costa F. 2009. First record of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), in Pará nut, *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae). Neotropical Entomology 38: 430–431.
- Hanski I. 1999 Metapopulation Ecology. Oxford University Press, Oxford, UK.
- López-Guillén G, Valdez-Carrasco J, Cruz-López L, Barrera JF, Malo EA, Rojas JC. 2011. Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. Environmental Entomology 40: 441-448.
- Mansingh A. 1991. Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. Journal of Coffee Research. 21: 67-98.
- Mathieu F, Brun LO, Frérot B. 1997. Factors related with native host abandon by the coffee berry borer (Ferr.) (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomology 121: 175-180.
- Noriyuki S. 2015. Host selection in insects: reproductive interference shapes behavior of ovipositing females. The Society of Population Ecology (Popul Ecol). 57:293-305.
- Parra JRP. 2012. Chapter 3. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In: Parra JRP. Ed. Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management.

- Silva WD, Moreira CC, Bento JMS. 2014. How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit? *Journal of Insect Behaviour* 27: 729-735.
- Ticheler J. 1961. Etude analytique de l'épidémiologie du scolyte des graines de café, *Stephanoderes hampei* Ferr. en Côte d'Ivoire. Landbouwhogeschool, Wageningen 61:1-49.

Cuadros.

Cuadro 1. Lista de órganos de plantas evaluados como refugios temporales de *H. hampei*.

Leyenda	Planta	Órgano vegetal	Hembras/tubo	Número de tubos
AR	<i>Cajanus cajan</i>	Vaina	20	10
HI	<i>Ricinus communis</i>	Fruto	20	10
CP	<i>Crotalaria maypurensis</i>	Vaina	20	10
TE	<i>Nectandra sp.</i>	Fruto	20	10
CA	<i>Coffea canephora</i>	Fruto	20	10
HO	<i>C. canephora</i>	Hojas	20	10
P	<i>C. canephora</i>	Pedúnculo	20	10
R	<i>C. canephora</i>	Rama	20	10
SS	Sin sustrato	-	20	10

Cuadro 2. Evaluación de la sobrevivencia de hembras colonizadoras de *H. hampei* en dos condiciones ambientales con presencia y ausencia de agua en las paredes de los tubos experimentales.

Condición ambiental	ID	Tratamiento	Hembras/ recipientes	Número de recipientes	Hembras/ recipiente
Interior de laboratorio (26 °C, 95.2 % HR)	LaW+W	Recipiente con paredes secas	20	19	380
	LaD+W	Recipiente con paredes mojadas	20	19	380
Exterior de laboratorio (26.8 °C, 76.2 % HR)	GaW+W	Recipiente con paredes secas	20	13	260
	GaD+W	Recipiente con paredes mojadas	20	13	260
Interior de laboratorio (22-28 °C, 55-85 % HR)	LaD+D	Recipiente con paredes secas	25	25	625

Cuadro 3. Tasa de sobrevivencia (%) de la broca en diferentes sustratos

Leyenda	Sustrato	Órgano	Humedad inicial (%)	Promedio de sobrevivencia al día 5	Promedio de sobrevivencia al día 10	Promedio de sobrevivencia al día 15	Promedio de sobrevivencia al día 20
AR	<i>Cajanus cajan</i>	Vaina	77.12	64.86	33.11	1.35	0.68
HI	<i>Recinus communis</i>	Fruto	87.68	56.02	25.30	10.84	7.83
CP	<i>Crotalaria maypurensis</i>	Vaina	63.00	67.43	28.57	1.14	2.86
TE	<i>Nectandra spp.</i>	Fruto	25.28	71.34	28.66	0.00	0.00
CA	<i>Coffea canephora</i>	Fruto	80,00	86.24	9.17	4.59	0.00
HO	<i>C. canephora</i>	Hoja	47.23	78.00	22.00	0.00	0.00
P	<i>C. canephora</i>	Pedúnculo	73.37	54.50	42.00	2.50	1.00
R	<i>C. canephora</i>	Rama	96.69	82.21	16.56	1.23	0.00
SS	Sin sustrato	-		80.49	17.07	2.44	0.00

Cuadro 4. Comparaciones múltiples de la sobrevivencia de *H. hampei* expuestos a diferentes refugios temporales. Arveja (*Cajanus cajan*) (AR), fruto de café (*Coffea canephora* Var. Robusta) (CA), chípilín de caballo (*Crotalaria maypurensis*) (CP), higuierilla (*Ricinus communis*) (HI), pedúnculo de café (*C. canephora* var. Robusta) (P), tepemixtle (*Nectandra* spp.) (TE), hojarasca (HO), ramas de *Coffea* sp (R), control (C). Letras diferentes indican diferencia significativa a y b ($\alpha=0.05$), c ($\alpha=0.01$), d ($\alpha=0.001$).

Sustrato	AR	SS	CA	CP	HI	HO	P	R
AR		0.0467 b	-	-	-	-	-	-
CA	0.4323 a	0.9993 a	-	-	-	-	-	-
CP	1.0000 a	0.0882 a	0.5907 a	-	-	-	-	-
HI	<0.001 d	<0.01 c	<0.001 d	<0.001 d	-	-	-	-
HO	0.0613 a	1.0000 a	0.9999 a	0.1148 a	<0.001 d	-	-	-
P	0.9929 a	<0.01 c	0.0497 b	0.9404 a	<0.001 d	<0.001 d	-	-
R	0.1206 a	1.0000 a	1.0000 a	0.2080 a	<0.001 d	1.0000 a	<0.01 c	
TE	0.9999 a	0.1527 a	0.7147 a	1.0000 a	<0.001 d	0.1971 a	0.8847 a	0.3183 a

Cuadro 5. Tasa de sobrevivencia (%) de la broca en diferentes ambientes

Condición ambiental	Leyeda	No. inicial de hembras	Promedio de sobrevivencia al día 5	Promedio de sobrevivencia al día 10	Promedio de sobrevivencia al día 15	Promedio de sobrevivencia al día 20
Interior de laboratorio (26 °C, 95.2 % HR)	LaW+W	380	67.59	28.39	3.77	0.25
	LaD+W	380	76.04	23.96	0.00	0.00
Exterior de laboratorio (26.8 °C, 76.2 % HR)	GaW+W	260	65.52	34.10	0.38	0.00
	GaD+W	260	79.04	19.49	1.47	0.00
Interior de laboratorio (22-28 °C, 55-85 % HR)	LaD+D	500	63.87	35.29	0.84	0.00

Cuadro 6. Comparaciones múltiples de la sobrevivencia de *H. hampei* evaluados en condiciones mojadas y secas bajo condiciones de interior y exterior del laboratorio. LaW+W = Tubos con paredes mojadas y ambiente húmedo bajo condiciones de laboratorio; LaD+W = Tubos con paredes secas y ambiente húmedo bajo condiciones de laboratorio; GaW+W = Tubos con paredes mojadas y ambiente húmedo bajo condiciones del exterior del laboratorio; GaD+W= Tubos con paredes secas y ambiente húmedo bajo condiciones del exterior del laboratorio; LaD+D = Laboratorio, pared seca, ambiente seco (Control) ** $\alpha = 0.005$.

Tratamiento	LaD+W	GaW+W	GaD+W	LaD+D
LaW+W	0.001 d	0.27757 a	< 0.001 d	0.51904 a
LaD+W	-	0.00227 c	0.95975 a	< 0.001 d
GaW+W	-	-	0.04485 b	0.96019 a
GaD+W	-	-	-	0.00110 c

Figuras.

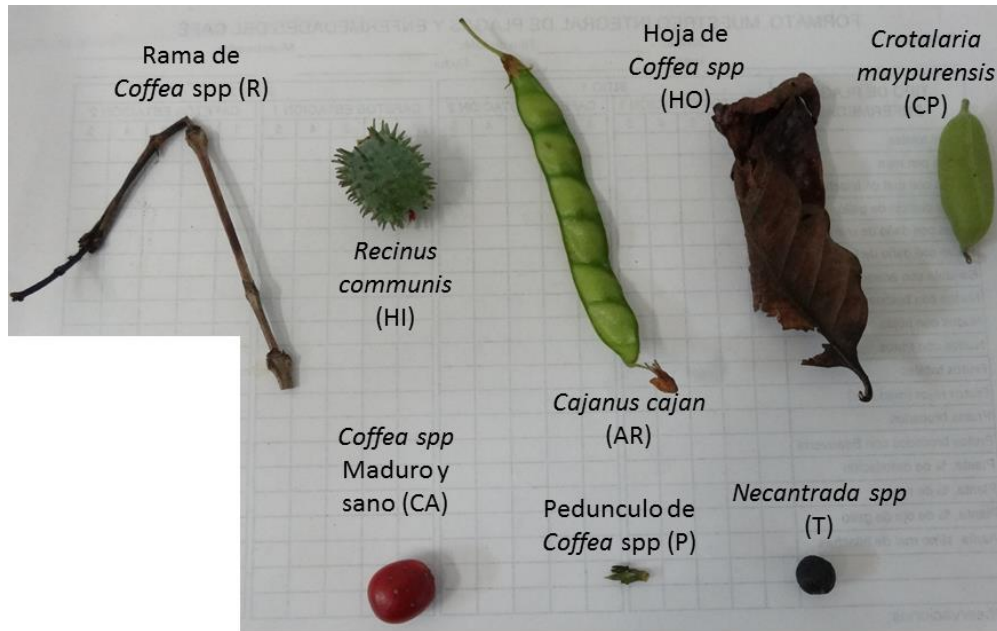


Fig. 1. Órganos de plantas evaluados como refugios temporales de *H. hampei*.



Fig. 2. Cámara húmeda albergando frascos aireados con broca y sustratos

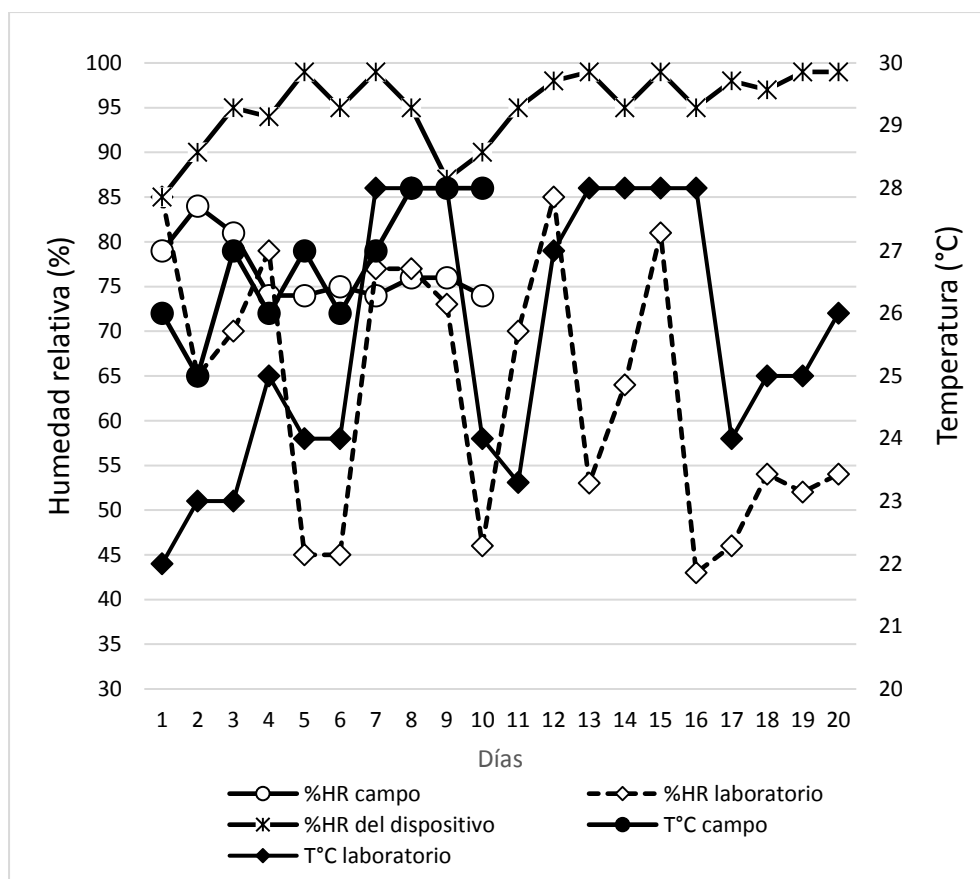


Fig. 3. Fluctuación de la temperatura (°C) y humedad relativa (%) durante los días de sobrevivencia de *H. hampei* en ambientes húmedos y secos.

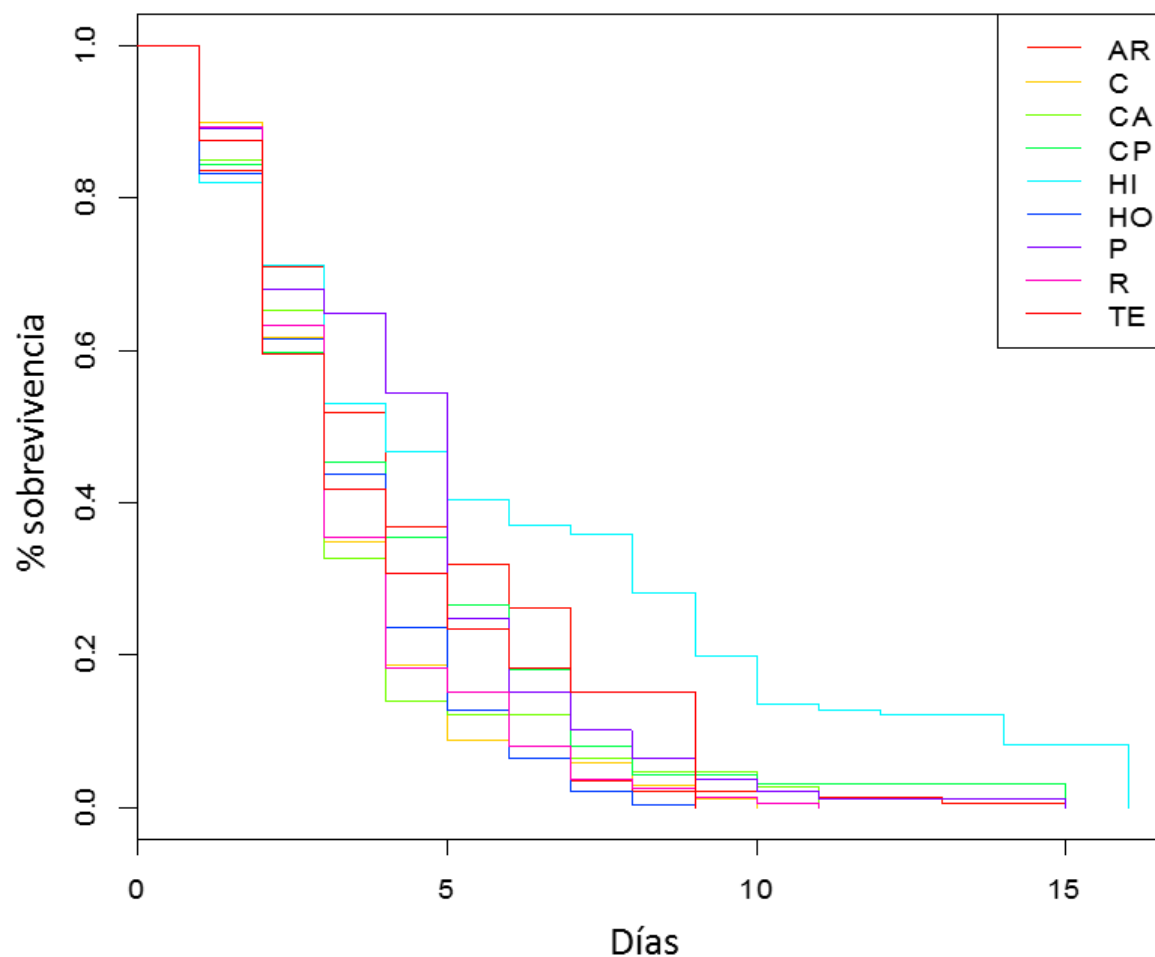


Figura 4. Porcentaje de sobrevivencia de las hembras colonizadoras de broca del café evaluadas en diferentes refugios temporales. *Cajanus cajan* (AR), Sin sustrato (C), *Coffea canephora* (CA), *Crotalaria maypurensis* (CP), *Ricinus communis* (HI), Hojarasca de *Coffea* spp (HO), Pedúnculo de *Coffea* spp (P), Ramas de *Coffea* spp (R), *Nectandra* spp. (TE).

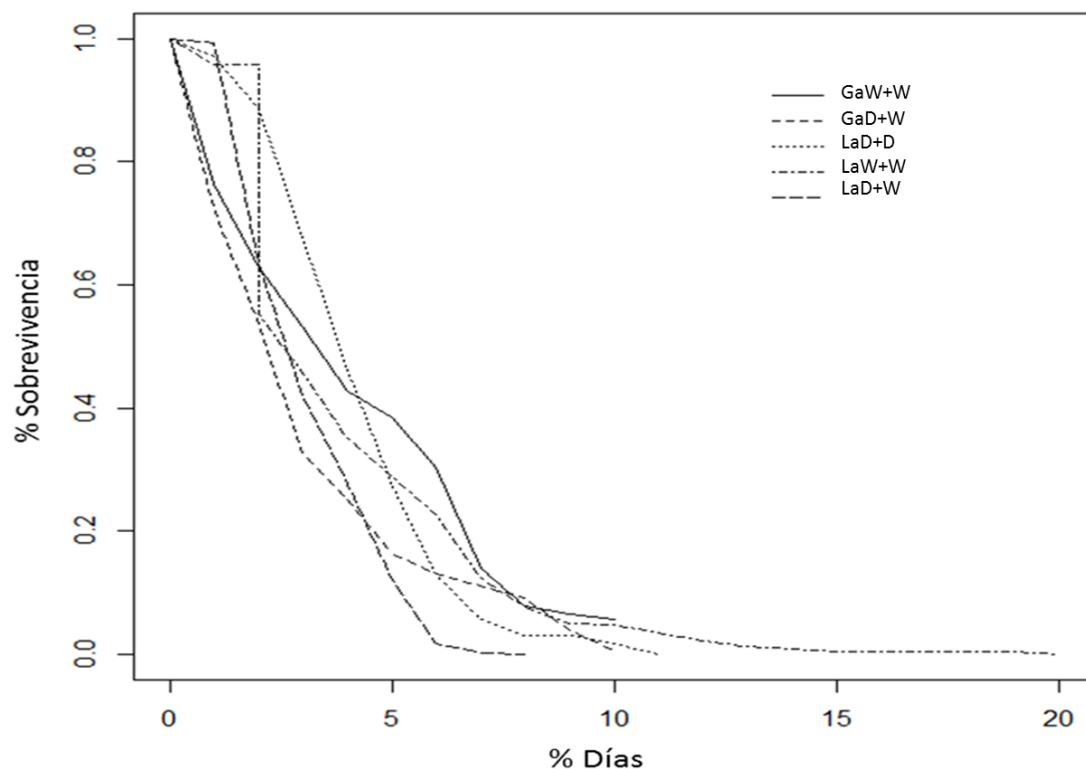


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia de las hembras colonizadoras de broca del café evaluadas en el interior y exterior del laboratorio expuestos a paredes secas y mojadas. Ambiente interior de laboratorio con frascos con paredes mojadas (LaW+W), Ambiente interior de laboratorio con frascos con paredes secas (LaD+W), Ambiente exterior de laboratorio con frascos con paredes mojadas (GaW+W), Ambiente exterior de laboratorio con frascos con paredes secas (GaD+W), Control con cajas de Petri con paredes secas y condiciones de laboratorio (LaD+D).

CAPÍTULO 4

Dispersión espacial de *H. hampei*

4.1. Dispersión a larga distancia de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) durante el periodo intercosecha.

Resumen

La broca del café (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es una de las principales plagas del café a nivel mundial. Durante el periodo intercosecha, las hembras colonizadoras de CBB sobreviven en frutos residuales del suelo y ramas; cuando se presentan las primeras lluvias, ocurre la mayor dispersión de hembras de CBB que se dispersan a sitios distantes para colonizar. En este estudio, se investigó la dispersión a larga distancia de CBB. Para ello, se evaluaron polvos fluorescentes como marcadores cuticulares y utilizarlos en el marcaje-liberación-captura de *H. hampei* para conocer el rango de dispersión de CBB. Los resultados obtenidos indicaron que los polvos fluorescentes DayGlo® son efectivos como marcadores cuticulares de CBB. Las capturas de hembras marcadas y rastros de CBB indicaron que la mayoría de las hembras colonizadoras se dispersan de 10 m a 20 m, y un menor porcentaje se dispersó a 75 m. Con ello, se demuestra la capacidad de CBB de dispersarse largas distancia, y potencialmente, este rango puede incrementar según la actividad estacional, la capacidad de vuelo de esta plaga, el uso de sustratos alternos asociados al cafetal y las estrategias de sobrevivencia ante los cambios climáticos.

Palabras clave: broca del café, marcaje cuticular, larga distancia, desplazamiento,

Introducción

En México y Centroamérica, el periodo intercosecha se extiende a partir de la mitad del periodo de secas hasta el principio de la estación lluviosa. Durante este tiempo, la broca sigue desarrollándose en los frutos de café residuales o remanentes en el suelo o las no cosechadas en cafetos, y por lo general, las hembras adultas quedan adentro en la espera de condiciones adecuadas para dispersarse. Al presentarse las primeras lluvias, las hembras conocidas como colonizadoras, emergen de las cerezas, vuelan hasta los estratos más altos de la vegetación y se dispersan en busca de nuevos sitios de colonización (Mathieu et al. 1997; Barrera et al. 2005).

Para controlar la broca en esta fase clave de su ciclo de vida, se implementaron programas de trampeo masivo mediante la utilización de trampas cebadas con atrayentes (Barrera et al. 2006; Dufour y Frérot, 2008). Con un radio de acción de 10-13 m por trampa, se logró optimizar el trampeo pero no se determinó precisamente la capacidad de dispersión de la broca (Dufour y Frérot, 2008). Baker (1984) midió el tiempo de vuelo que podía alcanzar en tres horas sumando varios vuelos sucesivos y encontró que esta plaga puede controlar su vuelo. Castaño et al. (2005) reportaron que la broca se podía dispersar hasta 15 m contiguos a un cafetal donde se eliminó el total de ramas aun con frutos remanentes y se dejaron distribuidas en el suelo (zoqueo). Por su lado, Olivas et al. (2010) lograron capturar hembras en trampas ubicadas en otros cultivos, retiradas a 140 m de una parcela de café infestada. Sin embargo no se pudo confirmar el origen exacto de las hembras capturadas.

La cuestión de la dispersión aún es un tema sensible en el mundo de la cafecultura, ya que se refiere a un gran número de productores que realizan buenas prácticas contra la broca en su propia plantación, pero corren el riesgo de infestación cuando el control de esta plaga no se realiza en las plantaciones o parcelas aledañas. En este sentido, el presente estudio tuvo como finalidad dar respuesta a este problema mediante el uso de un sistema de marcaje visual, para determinar la distancia recorrida de esta plaga cuando emergen masivamente de los frutos residuales. En consecuencia, los resultados obtenidos pueden contribuir en la determinación de las posibles soluciones para frenar o parar las dispersiones.

Los marcadores de insectos comúnmente utilizados son polvos fluorescentes comerciales, de fácil aplicación y detección (Hagler y Jackson 2001). Sin embargo, pueden influir en el desarrollo y comportamiento de los insectos (Meyerdirk et al. 1979; Narusy et al. 1999; Haglar y Jackson 2001). Hasta ahora, el marcaje de la broca ha sido probado por Acevedo et al. (2009) quienes utilizaron un polvo fluorescente *Day-Glo® rojo fuego (serie AX-14)* que se adhiere a la cutícula del insecto. Ellos encontraron que este polvo se retenía por cinco días, sin afectar a la broca, lo que permitía su posible uso como marcador detectable con luz UV.

En el marco de este estudio tres objetivos fueron definidos: 1) Demostrar el fundamento de la técnica de marcaje cuticular de las hembras colonizadoras de *H. hampei* con polvos fluorescentes *DayGlo® Blaze orange AX-15-N*, *Horizon blue A-19*, *Signal green AX-18-N* y *Saturn yellow AX-17-N*, 2) Elaborar una metodología de marcaje-liberación-captura adaptada al estudio de la dispersión, y 3) Estudiar el rango de dispersión a larga distancia de las hembras colonizadoras en la región del Soconusco.

Materiales y Métodos.

Área de estudio

La región de Cacahoatán, Chiapas, México, se caracteriza por presentar cultivos de *Coffea* spp., y forestales como *Tabebuia donnell-smithii* Rose y *Cedrela odorata* L., y plantas asociadas a los cafetales como *Cajanus cajan* L., *Yucca elephantipe* Baker in Regel, *Musa paradisiaca* L., *Cecropia peltata* L. y *Nectandra* spp. La temperatura anual media es de 26.1°C con una precipitación anual acumulada de 4600-5000 mm, aproximadamente. De acuerdo con Köppen (1918), el clima de esta región se clasifica como húmedo caliente-templado con una estación caliente lluviosa de junio a noviembre. El estudio se llevó a cabo en la finca “La Concepción”, municipio de Cacahoatán, localizado a 558 msnm (longitud 92°11.213' y latitud norte 15°01.110') durante el periodo inter cosecha de abril a mayo de 2015 y, marzo a mayo de 2016. El experimento fue realizado en un terreno de 2.0 ha aproximadamente, libre de cultivos, árboles de sombra o arbustos, cuyo manejo es ganadero. El terreno colinda al norte-este con cultivos de *Coffea canephora* var. Robusta y, al sur-oeste con potreros. Durante el experimento, las condiciones climáticas fueron de 26-28°C de temperatura, 60-70% de humedad relativa

y la dirección del viento fue de norte a sur a una velocidad de 0.2-0.6 m/s por la tarde, y la temperatura y humedad relativa fue de 24-26°C y 70-85%, respectivamente, durante la noche (ver abajo).

Preparación del área de estudio

Dos transeptos fueron trazados perpendicularmente, y uno de ellos estuvo en dirección al viento (norte-sur). En su intersección, se colocó una plataforma de liberación puesta sobre un soporte de madera de 2 m de altura (punto inicial) (Fig. 1). Trampas BROCAP® fueron colgadas a lo largo del transepto norte-sur sobre soportes de madera de 2 m de altura: dos a 20 m y 40 m al norte de la plataforma de liberación, cuatro a 20 m, 40 m, 60 m y 75 m, al sur de la plataforma. Otras dos trampas fueron colgadas a 20 m al este y oeste de la plataforma, a lo largo del transepto transversal (Fig. 1).

Material biológico

Las hembras colonizadoras de *H. hampei* que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron de frutos residuales de café (*C. canephora* Pierre) colectados durante el periodo inter cosecha (febrero-mayo 2015 y 2016) en las fincas “La Alianza” y “La Concepción”, municipio de Cacahoatán, Chiapas, México. Los frutos fueron almacenados en recipientes de plástico (30 cm de diámetro x 12 cm de alto), en un sitio fresco y oscuro hasta su utilización en cámaras de emergencia.

Inducción de la emergencia y colecta de hembras colonizadoras de *H. hampei*

Para inducir la emergencia de las hembras, los frutos brocados almacenados fueron sumergidos brevemente en agua, secados y luego depositados en cámaras de emergencia. Cada cámara es un recipiente de plástico negro: 72.5 cm de largo x 31.5 cm de ancho x 27.5 cm de alto, con seis orificios en la parte alta, en los cuales se enroscaron seis frascos de plástico translucido de 9.3 cm de diámetro y 16.5 cm de alto. Después de emerger de los frutos, la broca es atraída por la luz solar y se agrupa sobre la superficie de un pedazo de papel toalla insertado en cada frasco. La emergencia se aumenta entre

las 16:00 - 18:00 h. Las hembras se colectan con succionadores o pinceles de cerdas finas, y se contabilizan cuidadosamente.

En el marco de la evaluación de la técnica de marcaje cuticular de las hembras colonizadoras de *H. hampei* se realizaron varias pruebas preliminares con los polvos fluorescentes DayGlo® Blaze orange AX-15-N, Horizon blue A-19, Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N.

Cantidad de pigmento y adherencia a la cutícula

Con el objetivo de determinar la cantidad de pigmento adecuado y verificar su adherencia correcta a la cutícula, se colocaron grupos de 30, 50, 75 y 100 hembras en recipientes de plástico de 2.5 cm de diámetro x 5.5 cm de alto, cada uno asociado a 0.0001 g, 0.0004 g, y 0.0005 g de pigmento de un mismo color, o sea 12 tratamientos broca-pigmento, los cuales se repitieron diez veces. Este mismo procedimiento se realizó con los cuatro pigmentos, alcanzando el total de 480 unidades broca-pigmento. Los recipientes se sellaron con un pedazo de organza y se agitaron suavemente con movimientos circulares durante cuatro segundos. Una vez expuestos a los polvos fluorescentes, los insectos se retiraron y se colocaron en una placa de Petri para retirar el exceso de polvo. Enseguida, los insectos se expusieron a luz ultravioleta (UV) generada por una linterna eléctrica (51 UV LED Torche 395 nm) para comprobar la presencia del polvo en la cutícula de todo el cuerpo del insecto (adherencia).

Retención del polvo en la cutícula en ambientes secos y sobrevivencia de *H. hampei*

Para determinar la retención del polvo en la cutícula y la sobrevivencia de los insectos tratados, 30 brocas marcadas con cada uno de los cuatro pigmentos se colocaron, individualmente, en tubos eppendorf de plástico de 2 ml oradados en la tapa y sellados con un pedazo de organza con la finalidad de ventilarlos. Los contenedores con las hembras, se colocaron bajo condiciones controladas de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 70-80% de humedad relativa y, completa obscuridad. Diariamente se registró el número de brocas vivas y se determinó la retención del polvo por medio de la exposición a luz UV con la finalidad de observar la intensidad de la fluorescencia a través del tiempo. Las

hembras consideradas como muertas se observaron dos días más antes de confirmar su muerte. Treinta hembras fueron evaluadas por cada pigmento y como testigo, hembras de *H. hampei* sin marcar, se colocaron en tubos eppendorff bajo las mismas condiciones que las hembras marcadas.

Capacidad de vuelo de las hembras marcadas

Las hembras de CBB marcadas en el campo fueron colocadas en la plataforma para facilitar el despegue y vuelo. La plataforma fue hecha con dos láminas de 20 cm de poliestireno No. 9, para simular la base y el techo. Una lámina de poliestireno No. 4-S fue colocada a una distancia de 6 cm sobre la base (Ver sección 2.2). La plataforma fue colocada en el centro del área experimental. Se observó el despegue y vuelo de las hembras de CBB durante las 16 h a 18 h, a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 60-90% de humedad relativa. Las hembras que no volaron y quedaron en la plataforma fueron contabilizadas.

Por cada colorante, un total 350 hembras marcadas fueron evaluadas durante siete días y otro grupo de 50 hembras de broca sin marcar fueron utilizadas como testigo cada día de evaluación.

Resistencia de los pigmentos al agua

Las trampas BROCAP[®] utilizadas en los ensayos de liberación-captura tienen un recipiente de captura que contiene agua. La resistencia de pigmentos al agua ha sido una prueba para validar la técnica de captura de la broca marcada. Para ello se utilizaron siete trampas BROCAP[®] sin atrayantes, cada una fue colocada en una planta de café a 1.5 m de altura, distancia utilizada comúnmente en el monitoreo de esta plaga. En el contenedor de la trampa (recipiente translucido), se adicionaron 4 cm de agua. Se marcaron grupos de 50 hembras con cada uno de los colorantes, y se colocaron en el contenedor de agua. En cada uno de los recipientes, había un grupo de hembras marcadas con cada uno de los polvos fluorescentes y un grupo de hembras sin marcar el cual fungió como control. La finalidad del control fue conocer si el colorante aceleraba la degradación de los insectos bajo estas condiciones, el cual influye en la retención del polvo en la cutícula del insecto. Cada 24 h, hasta completar siete días de evaluación

(lapso que se mantienen las trampas en campo), se retiró una trampa que contenía a las hembras evaluadas. Las muestras fueron decantadas y pasadas por un pedazo de papel filtro con la finalidad de retirar el exceso de agua. Enseguida, la muestra se colocó en una caja de Petri y con un pincel de cerdas finas, se contabilizó y registró el número de hembras sin marcar y marcadas con cada uno de los polvos (expuestas a luz UV).

La técnica de marcaje-liberación-recaptura/rastros de hembras colonizadoras de *H. hampei* fueron elaborados a partir de los resultados de las pruebas anteriores. A continuación, se describe este método aplicado a la dispersión.

Para marcar las hembras recién emergidas, cada 20 min se colocaron grupos de 200 hembras, aproximadamente, en un recipiente de plástico de 2.5 cm de diametro x 5.5 cm de alto, con tapa oradada, donde se agregó 0.0004 g de pigmento fluorescente, se selló y agitó suavemente. Los polvos fluorescentes utilizados fueron Blaze orange AX-15-N, Horizon blue A-19, Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N, y por cada día de evaluación se utilizó un color diferente. El número de insectos marcados dependió del número de insectos obtenidos de las cámaras de emergencia por día de evaluación, en promedio 2000 hembras colonizadoras fueron evaluadas cada día de estudio. Enseguida, las hembras marcadas fueron colocadas en el centro de una plataforma de liberación ubicada en el centro del área de estudio (Fig. 1), para que las hembras volarán y detectarán el atrayente de las trampas colocadas alrededor de la plataforma o se dispersarán a cualquier dirección (ver metodología arriba). Dicha liberación se realizó semanalmente entre las 16 a 18 h, bajo condiciones de campo. Durante este tiempo se registró el despegue y vuelo de las hembras, así como las condiciones ambientales de temperatura, humedad relativa, velocidad de viento (m/s). Al finalizar las observaciones, se estimó el porcentaje de hembras sin actividad. En total, 22061 hembras colonizadoras marcadas fueron evaluadas.

Para determinar el rango de dispersión y el número de insectos dispersados, se realizaron observaciones nocturnas. Para ello, dos técnicas se utilizaron, a) Captura en trampas BROCAP® en seco cebada con una mezcla de metanol-etanol en proporción 3:1 colocadas en forma radial al punto de liberación (ver arriba), y b) Observaciones con luz ultravioleta (UV) generada por una linterna eléctrica (51 UV LED Torche 395 nm). En

ambos casos, durante las 17:40 y 23:00 h del día de evaluación y, uno y seis días después, se realizaron observaciones con luz UV de insectos marcados. Semanalmente, los recipientes de colecta fueron cambiados para evitar descomposición o depredación de los especímenes capturados. En el segundo caso, un flexómetro de 100 m fue colocado en el punto inicial (plataforma de liberación), y con desplazamientos radiales, se buscaron rastros de insectos marcados dentro del área de estudio. En ambos casos, la distancia de cada captura o rastro fue registrada, y se ubicaron las coordenadas de cada punto con un GPS.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de adherencia y capacidad de vuelo se analizaron con una tabla de contingencia. A su vez, los datos referentes a la solubilidad y permanencia del polvo en la cutícula del insecto bajo condiciones mojadas/húmedas se analizaron con una regresión lineal y, una prueba de Long-Rank fue utilizada para determinar la permanencia del polvo en ambiente seco y sobrevivencia de las hembras marcadas. Y, los datos obtenidos de la técnica de marcaje-liberación-captura/rastros se analizó con el método de patrones espaciales y el método Krilling, todos realizados con el paquete estadístico R versión 3.2.4.

Resultados

Marcaje y adherencia del polvo a la cutícula de *H. hampei*.

En todos los tratamientos evaluados los polvos fluorescentes se aplicaron y adhirieron fácilmente a la cutícula. El polvo fue perceptible a simple vista, pero cuando se expusieron a luz UV, la intensidad del polvo fue mayor y se observó en todas las partes del insecto.

Retención del polvo en la cutícula en ambientes secos y sobrevivencia de *H. hampei* marcadas cuticularmente.

En los experimentos realizados se observó alta retención del polvo en la cutícula de todos los insectos aún después de morir, y en ambientes secos, todos los polvos permanecieron en los insectos por más de 21 días. No obstante, la intensidad del polvo disminuyó con el transcurso del tiempo, pero aún fue perceptible cuando los insectos se expusieron a

luz UV. En cuanto a la sobrevivencia de las hembras de broca del café marcadas cuticularmente, el 90% de las hembras sobrevivieron de tres a cinco días cuando se evaluaron con los cuatro polvos, y el 100% de hembras no marcadas (control) sobrevivieron cinco días. Pero, un bajo porcentaje de hembras marcadas sobrevivieron 11, 13, 14 y 15 días con los polvos Blaze orange AX-15-N, Horizon blue A-19, Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N respectivamente, y con el testigo las hembras sobrevivieron 14 días (Fig. 2). Así, cuando se compararon los polvos entre sí, no se observó diferencia ($\chi^2=4.1$; $df=3$; $p=0.254$), en comparación con el control el cual si presentó diferencia significativa ($\chi^2=10$; $df=4$; $p=0.0398$).

Capacidad de vuelo de las hembras de *H. hampei* marcadas cuticularmente

Después de colocar las hembras marcadas en la plataforma de vuelo, algunas de ellas caminaron por la base de la plataforma, extendieron sus alas, despegaron y volaron en un lapso menor a 30 min, mientras que otras despegaron y volaron, inmediatamente. Los análisis realizados indicaron que, el polvo no influyó en la capacidad de dispersión de las hembras marcadas (χ^2 -squared = 0.5464; $df = 3$; p -value = 0.9086), bajo condiciones de 26-28°C de temperatura y 60-80 % de humedad relativa, sin corrientes de viento y en un área con poca radiación solar. El despegue y vuelo fue similar al que presentaron las hembras testigo.

Retención, solubilidad e identificación del polvo adherido a la cutícula de *H. hampei* bajo condiciones húmedas/mojadas.

Cuando las hembras de *H. hampei* marcadas cuticularmente, se colocaron en los contendores de las trampas BROCAP ® con agua, los pigmentos fluorescentes permanecieron en la cutícula del insecto, y no se observaron rastros de solubilidad del polvo en el agua. Al contabilizar los insectos marcados, el número de insectos identificados disminuyó a partir del primer día para todos los tratamientos. Pero, para el segundo y tercer día, incrementó el número de insectos marcados con el color Horizon blue A-19, Horizon blue y para el cuarto día la intensidad del polvo disminuyó y la detección de las hembras marcadas con este color fue menos preciso.

En el caso del polvo Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N, el marcaje cuticular se observó claramente hasta el cuarto día, y para el siguiente día, el número de insectos marcados disminuyó. En el sexto y séptimo día, los insectos marcados con los polvos Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N se identificaron fácilmente en comparación con los otros polvos. Sin embargo, a partir del cuarto día de evaluación, incrementó el número de insectos sin marcar (Fig. 3).

El número de insectos marcados con Blaze orange AX-15-N, fue menor durante los primeros cuatro días, en comparación con los otros polvos. Aunado a lo anterior, se observó que el número de insectos sin polvo incrementa conforme transcurre el tiempo, siendo más evidente en el tercer y cuarto día de evaluación (Fig. 4). A partir del cuarto día inició la degradación de las muestras, principalmente, en aquellos insectos marcados cuticularmente.

Marcaje-liberación-recaptura/rastros de hembras colonizadoras de *H. hampei*

De las 22061 hembras colonizadoras de *H. hampei* marcadas cuticularmente y liberadas en el sitio de estudio, se recapturaron 92 hembras y 208 rastros fueron localizados, los cuales se consideraron como movimientos de dispersión a larga distancia. Esta se realizó a diferentes distancias y direcciones del terreno de estudio, con desplazamientos radiales entorno al punto de liberación (Fig. 5). Las recapturas de las hembras de brocas marcadas, ocurrieron a 20, 40, 60 y 75 m de distancia (posición de las trampas en seco), y las marcas encontradas durante las búsquedas nocturnas se localizaron entre 3 m hasta 35 m, aproximadamente, del punto de liberación. Cabe mencionar que la distancia a la que se colocó la última trampa (75 m), fue debido a que en el terreno se encontró una barrera que impidió colocarla a la distancia real (80 m). También se observó que, el mayor porcentaje de rastros de hembras colonizadoras de broca se desplazaron entre 10 a 20 m de distancia del punto de liberación, y un menor número de hembras se dispersaron más de 40 m donde, únicamente, nueve hembras volaron a 60 m y tres hembras volaron 75 m (Fig. 6 y 7). Aproximadamente, el 60% de hembras liberadas por día, se encontraron en un radio de 1 m de distancia de la plataforma de liberación.

Discusión

Ensayos de los polvos fluorescentes como marcadores cuticulares de *H. hampei*

Los polvos fluorescentes evaluados, Blaze orange AX-15-N, Horizon blue A-19, Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N (DayGlo®), son adecuados para utilizarlos como marcadores cuticulares en el estudio de la dispersión espacial de *H. hampei*, según lo señalado por Hagler y Jackson, (2001), quienes indican que los marcadores de insectos no deben de interferir en su comportamiento. En estudios con otros insectos, el uso de polvos fluorescente aplicados directamente o en preparaciones (p. ej. resinas a base de estos polvos) son técnicas eficaces de marcaje en estudios de poblaciones en campo (Schellhorn et al., 2010).

En nuestro trabajo, encontramos que el marcaje cuticular del cuerpo completo de la broca del café, es fácil de detectar y se mantiene en la cutícula del insecto por más de 21 días bajo condiciones secas. También se encontró que, el 90% de insectos marcados con los cuatro polvos utilizados, sobrevivieron tres y cinco días, así como ocurrió con el polvo fluorescente rojo fuego (Serie Ax-14) (DayGlo®) el cual fue aplicado en el 75%, y 25-58% del cuerpo de brocas (Acevedo et al. 2009). Muchas investigaciones que estudian el efecto de los marcadores se enfocan en conocer la sobrevivencia de los organismos marcados, y muchos de estos no han mostrado un efecto negativo en esta variable (Reid & Reid, 2008 y citas en él). Caso similar se reportó con *Dendroctonus ponderosae*, donde los polvos fluorescentes utilizados como marcador cuticular entre los que se encontraron Blaze orange-A15 y Saturn yellow A17, no influyeron en la sobrevivencia de los insectos marcados (Reid & Reid, 2008).

También, observamos que el comportamiento de las hembras marcadas fue similar al de las hembras sin marcar. Debido a que todas las hembras evaluadas (marcadas y no marcadas) se desplazaron naturalmente por la plataforma de liberación, despegaron y volaron en menos de cinco minutos. En cambio, cuando Acevedo et al., (2009) evaluaron la capacidad de vuelo de las hembras marcadas en un 25-58% de su cuerpo, encontró que solo el 6% de ellas volaron, un porcentaje menor al que nosotros obtuvimos. Se ha reportado que, las altas temperaturas y humedad relativa favorecen el vuelo del insecto, y los ambientes secos con alto brillo solar inducen a que el insecto permanezca en su refugio (Alonzo, 1984; Cárdenas, 1993). Por ello, antes de la evaluación, se debe corroborar que las condiciones ambientales sean las adecuadas

para inducir el vuelo de *H. hampei*, las cuales deben ser $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 60-90% HR, en días despejados y sombra moderada (Román-Ruiz et al., datos no publicados).

Por otro lado, debido a que las hembras marcadas utilizadas para el estudio de la dispersión espacial de *H. hampei* se capturaron en trampas BROCAP®, a las cuales se le colocó agua para evitar el escape de las hembras capturadas, fue necesario evaluar el efecto del agua sobre la retención, solubilidad e identificación de los polvos fluorescentes. En este caso se observó que, los polvos son insolubles en agua, pero su retención sobre la cutícula del insecto está influenciado por el efecto que el agua genera sobre los tejidos del insecto, y la formación de agrupaciones de insectos marcados con los no marcados, los cuales se observaron al tercero y segundo día de evaluación, respectivamente. A partir del tercer día del experimento, la mortalidad de los insectos –marcados y sin marcar– inicio, y con ello la degradación de los insectos. En el caso de los polvos Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N, son los que mejor se identificaron hasta el cuarto día, después estos se confunden debido a la degradación de los insectos. En cambio, los polvos Blaze orange AX-15-N y Horizon blue A-19, fueron los que menos se identificaron. El primero, pierde permanencia en la cutícula del insecto a partir del segundo a tercer día de estudio, y el segundo, se mezcló con los insectos no marcados a partir del tercer día. Por lo que, la confiabilidad de detectar a estos colorantes después de permanecer tres días en agua disminuye (Fig. 3). No obstante, esto no es limitante para realizar los estudios de la dispersión espacial de *H. hampei*, ya que pueden utilizarse las trampas en seco y, así los monitoreos pueden realizarse semanalmente, como se acostumbra en la región del Soconusco.

Cabe mencionar que, a pesar que las hembras marcadas con el polvo Blaze orange AX-15-N presentaron menor sobrevivencia y su identificación cuando se encuentra en agua se dificulta a partir del segundo a tercer día, su identificación y contraste con el medio bajo condiciones secas y en campo es mayor con respecto a los otros polvos evaluados. Debido a que las observaciones de capturas o rastros de hembras marcadas que se dispersaron se realizaron el mismo día, al siguiente y sexto día de la evaluación, bajo condiciones secas, este se considera como un buen marcador

cuticular para el estudio de la dispersión de la broca, seguido del polvo Saturn yellow AX-17-N, Signal green AX-18-N y Horizon blue A-19.

Aplicación del marcaje en la técnica marcaje-liberación-captura para el estudio de la dispersión a larga distancia de *H. hampei*

El marcaje-liberación-captura permitió conocer que las hembras colonizadoras de broca se dispersan largas distancias cuando hay ausencia de barreras (p. ej. estrato arbóreo, plantas de café). Los insectos marcados que se recapturaron correspondieron al 6% del total de insectos liberados, aproximadamente. Resultados similares han sido reportados en trabajos de marcaje-liberación-recaptura con escolítidos. Se presume que esta tendencia se debe al comportamiento de dispersión de los organismos y, a que la posibilidad de recapturar o encontrar individuos marcados disminuye con la distancia (Zolubas y Byers, 1995; Martay et al. 2014). Por ejemplo, al estudiar el comportamiento del vuelo de *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) en un ambiente sin feromonas, se encontró que de 11765 insectos marcados y liberados, solo 8612 despegaron y 41 insectos fueron recapturados (0.35% aproximadamente) (Franklin & Grégoire, 1999). Y, cuando se estudió la dispersión localizada e influencias ambientales de *I. typographus*, alrededor del 7 % y 2.3 % de insectos marcados fueron recapturados con 64 y 100 trampas, respectivamente (Franklin et al. 2000).

Con los datos obtenidos de la técnica de marcaje-liberación-captura, se estimó el rango de dispersión a larga distancia de *H. hampei* bajo condiciones de campo (temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de 60-90% y viento casi nulo), en un área libre de obstáculos (plantas de café, estrato arbóreo, refugios temporales), el cual alcanzó hasta 75 m de distancia después de 5-6 h de evaluación, siendo de 10 a 20 m la distancia en la que se encontraron la mayoría de las hembras de *H. hampei* marcadas y liberadas (Figura 5, 6 y 7). Su dispersión ocurrió de manera radial al punto de liberación. Después de 24 h de la liberación, se encontraron hembras marcadas recapturadas en las trampas BROCAP® ubicadas a 20 m y 60 m en posición noreste (cuatro hembras aprox.). Este resultado, puede estar influenciado por las condiciones ambientales que se presentó en el periodo transcurrido. Algunos autores han indicado que el desplazamiento de *H. hampei* puede ser de 348 m en Java, 300-400 m en República Democrática del Congo

con una elevación de 4-5 m, o que vuelan 5 m o más cuando se ayudan del viento, pero dichos resultados fueron diferentes a los utilizados en este trabajo (Leefmans 1923; Leroy 1936). Situación similar a la reportada con *I. typographus* capturado en un rango de 120 a 1000 m, *I. paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae) recapturado a 2 km y, *Trypodendron lineatum* (Coleoptera: Scolytidae) y *Dendroctonus ponderosae* Hopkins recapturados a 500 m (Salom y McLean 1989; Zolubas y Byers 1995; Duelli et al. 1997; Barclay et al. 1998, Byers 2000), donde las brechas entre trampas facilitaron su desplazamiento con ayuda del viento.

Cárdenas y Posada (2001), reportaron que las hembras de broca pueden volar en patrón de espiral por 1-2 h, lo que permite una amplia dispersión si el viento es prevalente. En estudios realizados en laboratorio sobre la capacidad que tiene *H. hampei* para realizar más de un vuelo una vez que emerge de frutos residuales, se observó que cuando realizan un vuelo diario y no han tenido contacto con un fruto de café, el 50% de las hembras evaluadas (n=240) pueden realizar hasta tres vuelos y, la capacidad de refugiarse en sustratos diferentes al fruto de *Coffea* spp., indican la posibilidad de que el insecto se disperse una mayor distancia (Román-Ruiz et al. datos no publicados).

En otros insectos se ha reportado que el rango de desplazamiento puede ser mayor según su forma de dispersión, pasiva (p. ej. transporte antropogénico), semi pasiva (p. ej. a nuevos sitios) o activa (p. ej. por medio del vuelo) donde las corrientes de viento pueden jugar un papel importante (Chase et al. 2016). Estos tipos de dispersión han sido observados con *H. hampei*, durante su introducción a regiones no endémicas o en infestaciones regionales y locales, respectivamente (Vega et al. 2015). En este sentido, este estudio es un punto de partida para continuar con los estudios de dispersión de esta plaga, y mejorar el sistema de trampeo utilizado como estrategia de control. Por ello, este trabajo, brinda un panorama sobre el rango y estudio directo de la dispersión activa de *H. hampei* en áreas sin obstáculos, ya que la presencia de un fruto infestado con broca, es suficiente para que se infeste una nueva área, debido a que un fruto residual alberga decenas de brocas colonizadas e inseminadas, listas para continuar con la colonización (Román-Ruiz et al. 2017). Por ello, es importante realizar este tipo de trabajo, para comprender el comportamiento de dispersión de *H. hampei* y así, mejorar el manejo de esta plaga.

En conclusión, los polvos fluorescentes Blaze orange AX-15-N, Horizon blue A-19, Signal green AX-18-N y Saturn yellow AX-17-N (DayGlow), son considerados marcadores funcionales para el estudio de la dispersión espacial de esta plaga, debido a que se adhieren, retienen e identifican fácilmente en la cutícula de *H. hampei*, persiste bajo las condiciones de estudio y no interfiere en el desplazamiento del insecto. Su uso en la técnica de marcaje-liberación-captura, facilita el estudio directo de la dispersión de *H. hampei* y, permite evidenciar el rango de dispersión a larga distancia de esta plaga, en áreas libres de obstáculos. Su dispersión ocurre de manera radial al punto de liberación, donde la mayoría de hembras colonizadoras de broca se dispersan entre 10-20 m durante las primeras 6 h del abandono del fruto residual, y esporádicamente, se dispersan hasta 75 m de distancia.

Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere mejorar el sistema de trampeo con atrayentes a mayores distancias de los focos de infestación de broca, con la finalidad de reducir las poblaciones de esta plaga y las pérdidas económicas. Así como, realizar evaluaciones en áreas donde predomine su hospedero natural, y en diferentes periodos fenológicos del cultivo, para mejorar el conocimiento de la dispersión espacio-temporal de este insecto, y de su manejo integrado.

Agradecimientos

Agradecemos a Enrique López, Sergio Dorian Moreno, Dulce Gonzalez-Castillo y José Luis López de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) por su apoyo técnico. Finalmente, agradecemos al *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD), al *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado como beca doctoral de A.K.R.R., número de beca 777606C y 293465, respectivamente.

Literatura citada

- Acevedo BFE, Gil PZN, Bustillo PAE, Montoya REC, Benavides MP. 2009. Evaluación de marcadores físicos y moleculares como herramientas para el estudio de la dispersión de *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 60:72-85
- Alonzo PFR. 1984. Aspectos ecológicos de la broca *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). El problema de la broca (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) y la caficultura. Aspectos relacionados con importancia, daño, identificación, biología, ecología y control. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura. San José (Costa Rica). 77-136.
- Baker PS. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomologica Mexicana* 61: 9-24.
- Barclay HJ, Safranyik L, Linton D. 1998. Trapping mountain pine beetles *Dendroctonus ponderosa* (Coleoptera: Scolytidae) using pheromone-baited traps: effects of trapping distance. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 95: 25-31.
- Barrera JF, Herrera J, Valle J. 2005. Efecto de la altura de la trampa en la captura de la broca del café: implicaciones en dispersión y muestreo. *Entomología Mexicana*, 4, pp.542–546.
- Barrera JF, Herrera J, Villacorta A, García H, Cruz-López L. 2006. Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei* pp.71-83. In Barrera JF, Montoya P. Eds. Simposio sobre trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur, Manzanillo, Colima, México.
- Byers J. A. 2000. Wind-aided dispersal of simulated bark beetles flying through forests. *Ecological Modelling*, 125: 231-243.
- Cárdenas MR. 1993. Biología, hábitos y control cultural de la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) (Coleoptera; Scolytidae). *Memorias del XX congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*. Cali, Pp. 344.

- Cárdenas MR, Posada FF. 2001. Los insectos y otros habitantes de cafetales y platanares. Centro Nacional de Investigación de Café. Chinchiná, Colombia. Pp. 250.
- Castañó SA, Benavides MP, Baker PS. 2005. Dispersión de *Hypothenemus hampei* en cafetales zoqueado. *Cenicafé* 56: 142-150.
- Chase KD, Kelly D, Liebhold AM, Bader MKF, Brockerhoff EG. 2016. Long-distance dispersal of non-native pine bark beetles from host resources. *Ecological Entomology*. DOI: 10.1111/een.12371.
- Dufour BP, Frérot B. 2008. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col. Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. *Journal of Applied Entomology* 132: 591-600.
- Franklin AJ, Debruyne C, Grégoire JC. 2000. Recapture of *Ips typographus* L. (Col. Scolytidae) with attractants of low release rates: localized dispersion and environmental influences. *Agricultural and Forest Entomology* 2: 259-270.
- Franklin AJ, Grégoire JC. 1999. Flight behaviour of *Ips typographus* L. (Col. Scolytidae) in an environment without pheromones. *Annals of Forest Science* 56: 591-598.
- Hagler JR, Jackson CG. 2001. Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology*, 46: 511-543
- Köppen W. 1918. Klassifikation der Klimate nach Temperatur, Niederschlag und Jahreslauf. *Petermanns Mitteilungen* 64: 193-203.
- Leefmans S. 1923. De Koffiebessenboeboek (*Stephanoderus hampei* Ferrari= *coffeae* Hagedorn). I. Levenswijze en oecologie. *Mededeelingen van het Instituut voor Plantenzieken* 57: 1-93.
- Leroy JV. 1936. Observation relatives à quelques insectes attaquant le caféier. *Publications de l'institut national pour l'étude agronomique du Congo Belge, Série Scientifique* 8:1-30
- Mathieu F, Brun LO, Marchillaud C, Frérot B. 1997. Trapping of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferr. (Col., Scolytidae) within a mesh-enclosed environment: interaction of olfactory and visual stimuli. *Journal of Applied Entomology* 121: 181–186.

- Martay B, Robertshaw T, Doberski J, Thomas A. 2014. Does dispersal limit beetle recolonization of restored fenland? A case study using direct measurements of dispersal and genetic analysis. *Restoration Ecology* 22: 590-597.
- Meyerdirk DE, Hart WG, Burnside J. 1979. Marking and dispersal study of adults of the citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi*. *Southwestern Entomologist*. 4:325–29.
- Narisu, Lockwood JA, Schell SP. 1999. A novel mark-recapture technique and its application to monitoring the direction and distance of local movements of rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in the context of pest management. *Journal of Applied Ecology*. 36:1-15.
- Olivas A, Rivera C, Dufour BP, Hidalgo E, DeClerck F, Avelino J. 2010. Micro-landscape context effects on the dispersal of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Costa Rica. Poster, In proceedings of international conference of Coffee science (ASIC), Bali, Indonesia, 23, 2010/ 03-08, 996-998.
- Reid TG, Reid ML. 2008. Fluorescent powder marking reduces condition but not survivorship in adult mountain pine beetles. *The Canadian Entomologist* 140: 582-588.
- Román-Ruiz AK, Dufour BP, Michel B, Rojas JC, Cruz-López L, Barrera JF. 2017. Description of the sperm and spermathecal of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) for the differentiation of mated and unmated females. *Annals of the Entomological Society of America* DOI:<https://doi.org/10.1093/aesa/sax033>.
- Schellhorn N, Siekmann G, Paull C, Furness G, Baker G. 2004. The use of dyes to mark populations of beneficial insects in the field. *International Journal of Pest Management* 50: 153-159.
- Vega EF, Infante F, Johnson AJ. 2015. The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer. In Vega FE, Hofstetter RW. Eds. *Bark Beetles, Biology and Ecology of Native and Invasive Species*, Oxford UK. Pp 427-494.
- Zolubas P, Byers JA. 1995. Recapture of dispersing bark beetle *Ips typographus* L. (Col. Scolytidae) in pheromone-baited traps: regression models. *Journal of Applied Entomology* 119: 285-289.

Figuras.

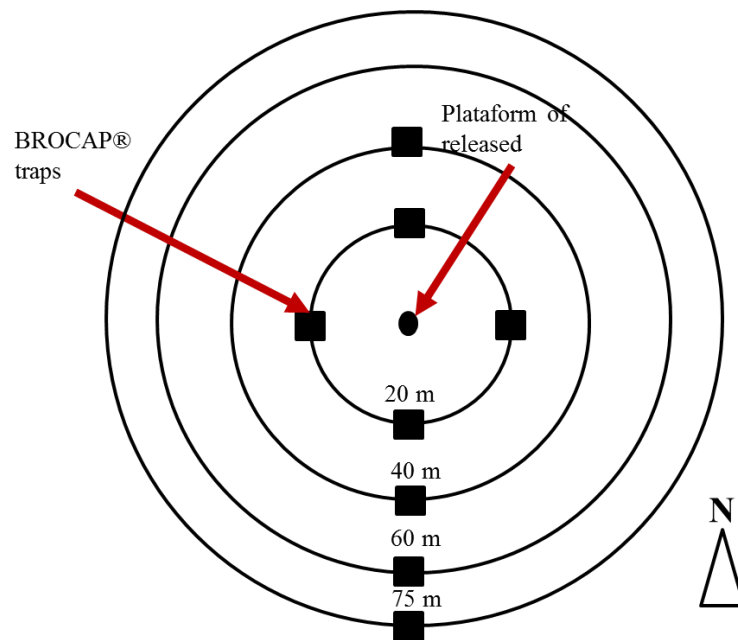


Fig. 1. Diseño experimental de liberación y captura en trampas BROCAP® de hembras de *H. hampei* marcadas cuticularmente con polvos fluorescentes *DayGlo*®.

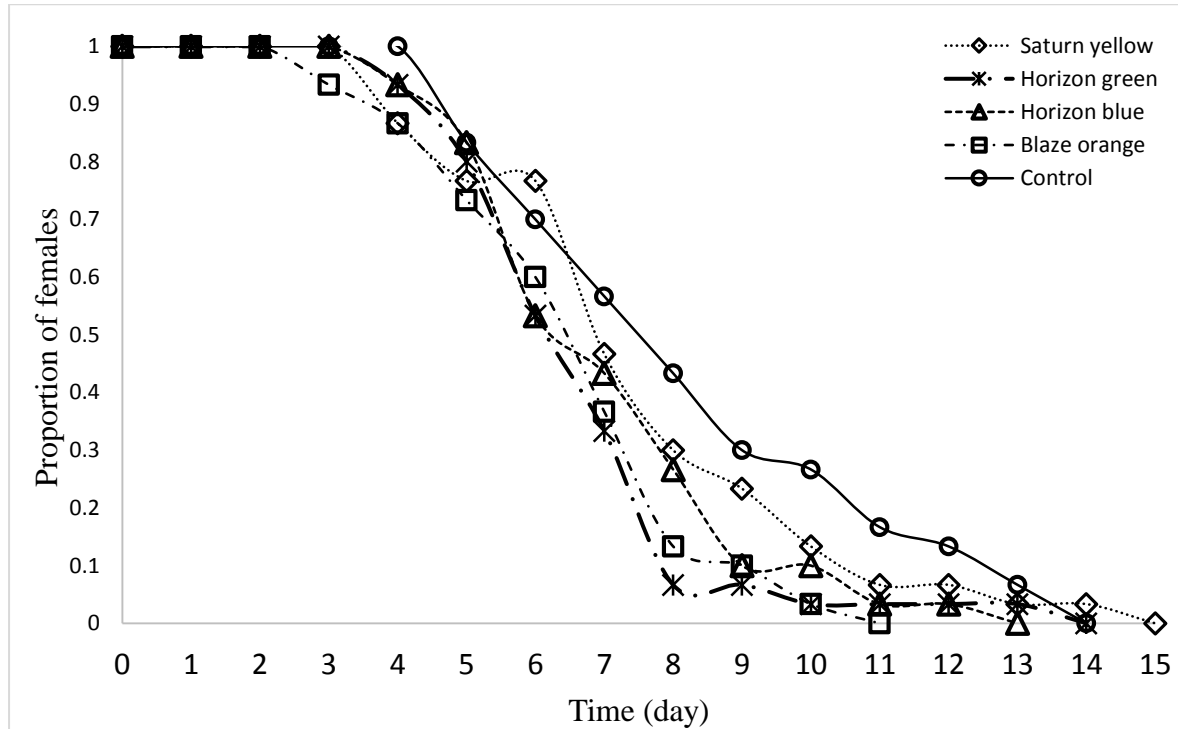


Fig. 2. Supervivencia de las hembras de *H. hampei* marcadas cuticularmente con polvos fluorescentes y sin marcar (ctrl).

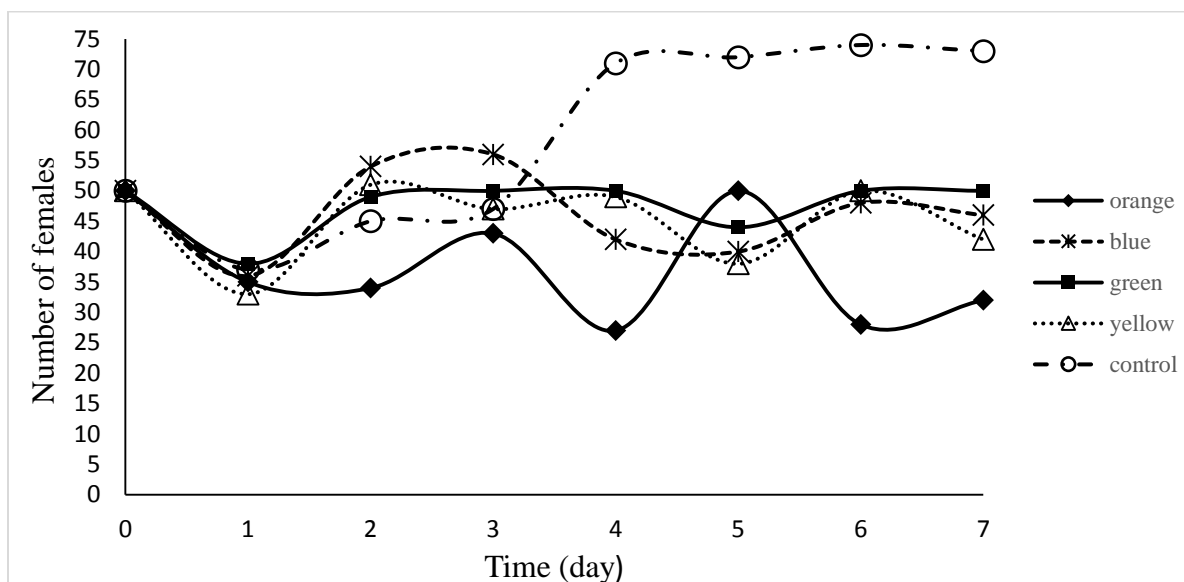


Fig. 3. Evolución del número de hembras de *H. hampei* identificadas después de marcarlas cuticularmente con polvos fluorescentes y colocarlas bajo condiciones húmedas/mojadas.

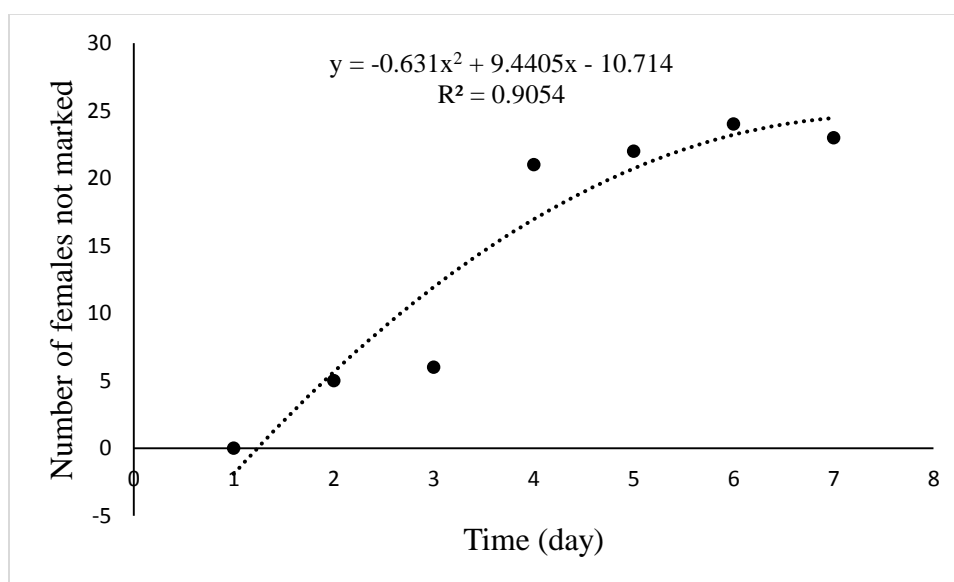


Fig. 4. Número de hembras de *H. hampei* que perdieron el marcaje cuticular original después de colocarlas bajo condiciones húmedas/mojadas.

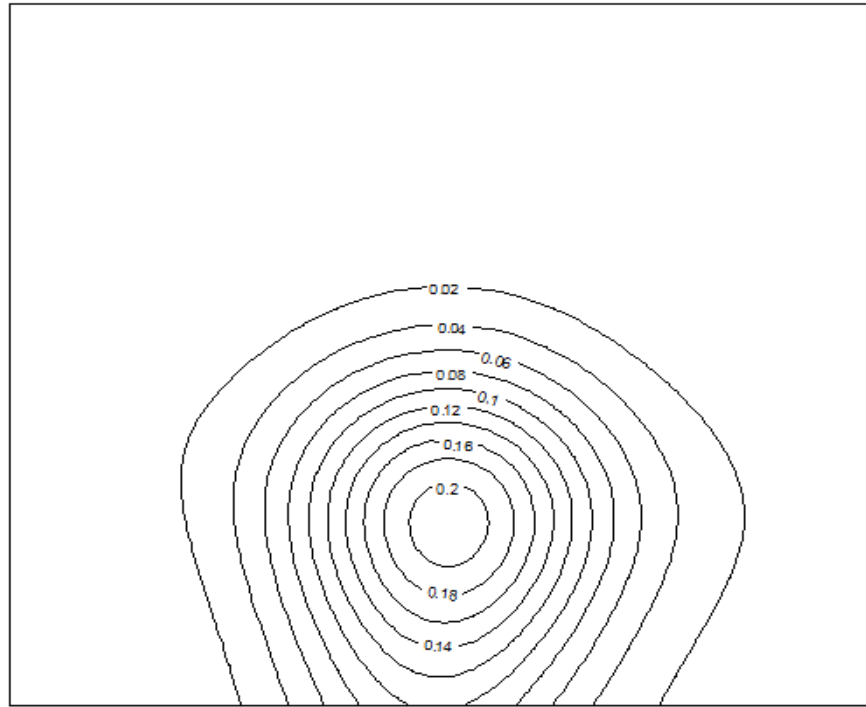


Fig. 5. Representación de la dispersión de hembras colonizadoras de *H. hampei* y proporción de hembras capturadas/rastros por medio de la técnica de marcaje-liberación-captura/rastros.

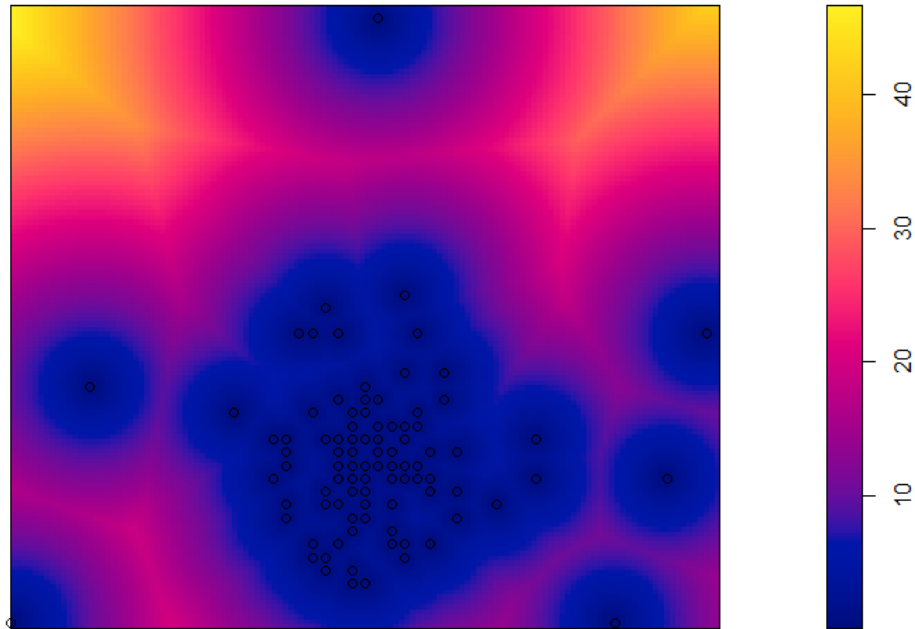


Fig. 6. Representación del movimiento por medio del vuelo de las hembras colonizadoras de *H. hampei* evaluadas con la técnica de marcaje-liberación-captura/rastros.

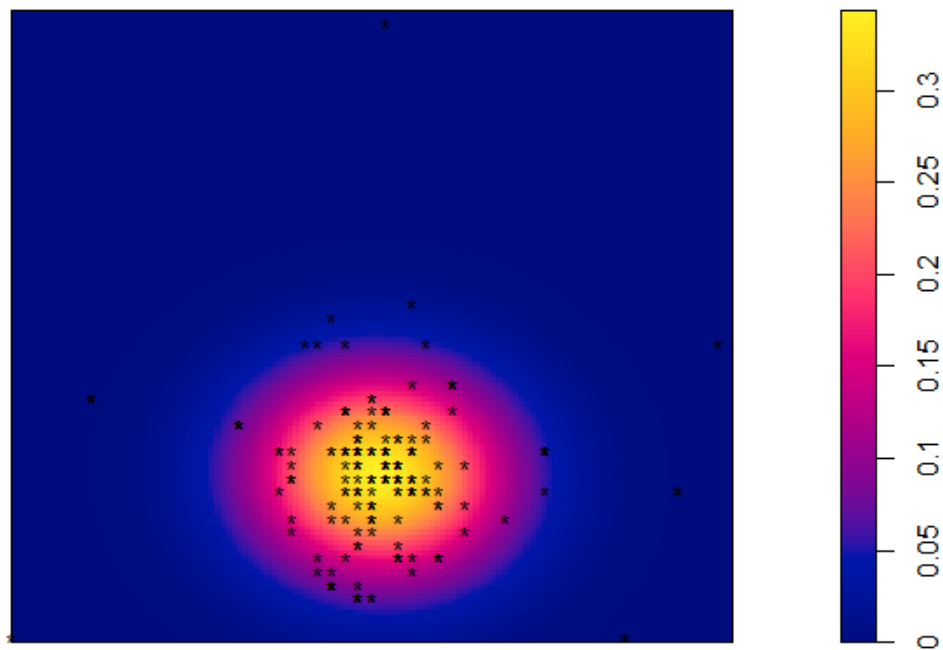


Fig. 7. Proporción de capturas en trampas BROCAP ® en seco y rastros de marcas de hembras colonizadoras de *H. hampei* marcadas cuticularmente con polvos fluorescentes

4.2. Dispersión a corta distancia de *H. hampei*

Los resultados de esta sección se encuentran en el artículo: Short distance dispersion of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae) during fruiting period of coffee trees.

Manuscrito enviado a la revista indexada: Bulletin of Entomological Research.

Journal: *Bull Entomol
Research*
Section:
Running head: Short dispersal
of *Hypothenemus hampei*

Bernard P. Dufour
Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le
Développement (CIRAD), UPR 106,
Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier, France
E-mail: bernard.dufour@cirad.fr

Short-distance dispersal of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females (Coleoptera:
Curculionidae: Scolytidae) during the coffee tree fruiting period

Authors:

Román-Ruiz Ariana K.^{1,2}, Ribeyre Fabienne², Rojas Julio C.¹, Cruz-López Leopoldo¹,
Barrera Juan F.¹ & Dufour Bernard P.^{2*}

¹El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5, C.P.
30700; Tapachula, Chiapas, México.

²CIRAD, UPR 106, F-34398 Montpellier, France.

*Corresponding author: bernard.dufour@cirad.fr

Telephone number: +33 467593710

Abstract

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari), is a multivoltine species closely associated with coffee crops worldwide, causing severe damage to the bean. In Mexico, as in all tropical regions, CBB survives during the inter-harvest period in residual berries on the ground or in dry berries remaining on the branches, and then disperses in search of the first suitable berries. In this study, we investigated how CBB dispersed from the first infested nodes during the fruiting period of *Coffea canephora* Pierre, which provides a favourable trophic level for this insect. Forty-five branches equally distributed in 15 coffee trees, with one infested node and four uninfested nodes, were selected. The branches were subjected to three treatments over nine weeks: 1) glue between nodes with full protection, 2) glue between nodes without protection, and 3) no glue and no protection. In addition, 45 CBB-free branches were selected and subjected to the same three treatments. CBB colonization can occur in three ways: 1) from an infested node to an uninfested node on the same branch, 2) from infested berries to uninfested berries within the nodes, 3) from branches to other branches. We also found that CBB dispersal between nodes of the same branches never occurred by walking but by flying. Thus, in this context of coffee berry development and ripening, and unlike the phenological situation of the inter-harvest period, CBB continuously travels very short distances, thus limiting its control.

Keywords:

Coffee berry borer, infestation, spread, branch, node.

Introduction

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae), is a major insect pest of coffee crops worldwide (Le Pelley, 1973, Waterhouse & Norris, 1989, Barrera, 2008). It is a multivoltine insect that remains most of its life inside the fruit (Baker et al., 1984). Upon adult emergence, which occurs when they are about 15-16 days old (Mathieu et al., 2001; Silva et al., 2014), females mate with their siblings, leaving their natal berries, and start flying to search for new berries (Baker et al., 1992; López-Guillén et al., 2011). Once CBB females find suitable berries, they begin to bore into them, making irregular galleries in the endosperm to deposit their eggs, and in which their progeny will eventually develop (Mansingh, 1991; Damon, 2000). In general, they bore one hole per berry, except in cases of artificially heavy infestations or during periods of intense infestation, where more than one female may bore into a single berry (Wrigley, 1988; Vega et al., 2015). This study was carried out at a very understudied stage of the infestation process, at the beginning of the coffee tree fruiting period.

In wet tropical climates with two strongly marked seasons (i.e., dry season and wet season), mass emergence followed by the greatest dispersal of CBB occurs from residual infested berries on the ground before or during the harvest, and dry berries abandoned on the branches of the coffee trees after harvest (Dufour et al., 2001). This phenomenon occurs during the inter-harvest period, after the first rains at the end of the dry season. The mass emergence of CBB from residual infested berries is due an abrupt increase in humidity combined with high temperatures (Baker et al., 1992; Giordanengo, 1993; Barrera, 1984; Mathieu et al., 1997; Dufour et al., 2000; López-Guillén et al., 2011). The olfactory capacities of CBB females guide them towards suitable coffee berries, thus ensuring a food source and a breeding site (Ticheler, 1961; Giordanengo et al., 1993; Mathieu et al., 2001).

During the fruiting period, from June to November, little migration movement is observed in the field and very few CBB are caught by semiochemical-baited traps (Barrera et al., 2006), though CBB populations develop rapidly up to the harvest, and cause serious coffee crop losses. For instance, Guzmán et al., (1997) reported that the infestation rate can rise from 27% to 67% in under four months. However, it is unknown how the dispersal process occurs during infestations in the berry ripening period.

This study therefore raised two main questions: a) Is walking the most frequent way of CBB displacement? and b) Do CBB females move to the nearest available berries or disperse systematically to other nodes or other branches? It was expected that the results of this study might help in understanding the *H. hampei* dispersal process when its populations have plenty of available coffee berries, and provide a clearer picture of CBB ecology and biology, for its effective management.

Materials and methods

Study area. The study was conducted on the “La Alianza” farm (15.046667 N and -92.182778 W, 670 masl), Cacahoatán, Chiapas, Mexico, in the fruiting period from the end of June to the end of August 2015. The study area was characterized by an average annual temperature of 26°C and an annual rainfall of 4600 mm. A 1-ha plot planted with *C. canephora* Var. Robusta was selected in a plantation including other crops such as *Cajanus cajan* (L.) Mill sp., *Yucca elephantipes* Baker in Regel, *Musa x paradisiaca* (L.), *Cecropia peltata* L. and *Nectandra* sp., as well as forest species such as *Tabebuia donnell-smithii* Rose and *Cedrela odorata* L. The coffee trees were about 9 years old and planted 5 m apart (400 plants/ha), and were 3-4 m tall. The single flowering occurred at the end of January. No chemical pesticides were used to control insects and diseases.

Experimental design and experimental conditions. In the study area, 15 coffee trees were randomly selected. In the central part of each one, six branches with five nodes and at least four fruits per node were chosen. The selected coffee trees were bearing the first production of suitable berries, which were at the green stage with at least 20% dry content (Baker, 1984, 1999; Bustillo et al., 1998; Barrera et al., 2006; Vega et al., 2015). The experimental design included three treatments assigned to branches infested by *H. hampei*, and three identical treatments assigned to branches free of infestation, being used as an absolute control and, consequently, not included in the analysis of dynamics. Thus, the treatments involved were: 1) without glue and protection + first node infested (control), 2) application of glue (Pelton Glu®, France) between nodes + first node infested, 3) application of glue between nodes and complete protection of the branch with tulle + first node infested, 4) without glue and protection + initially free of infestation, 5)

application of glue between nodes + initially free of infestation, and 6) application of glue between nodes and complete protection of the branch with tulle + initially free of infestation (Fig. 1). The treatments were positioned in each tree at random. On infested branches, only the first node berries perforated by *H. hampei* were used (Fig. 1). If the nodes had more than three infested berries, the excess was removed. In each coffee tree, the berries and nodes on the selected branches were marked (Fig. 1). Preliminary trials showed that the glue effectively trapped CBB. The pieces of tulle surrounding the branches like sleeves were sealed at the ends of nodes one and five with rigid plastic links.

The CBB caught with glue, as well as infested berries, were recorded and removed weekly between 11 am and 2 pm over the duration of the experiment. Also, the total number of infested and uninfested berries was recorded according to the node location, at the beginning and the end of the experiment. During the experiment, the temperature ranged from 26 to 28°C, and the relative humidity from 80 to 100%.

Statistical analysis. For each date and treatment, we calculated: 1) the number of infested nodes per branch (from 0 to 5), and 2) the average number of perforated berries per infested node and per branch. The differences between the initial and final number of berries per branch and per treatment, and the differences between infested nodes per branch and bored berries per infested node were analysed by the non-parametric Friedman test. The curves of the trajectories (infestation as a function of time) which reflected the number of infested nodes per branch and the number of perforated berries per infested node were classed. While the development of infestation was more important than the time when it occurred, we chose a method of clustering based on the shape-respecting “generalized distances of Fréchet” between trajectories rather than on classic distances. We used the kmlShape method based on k-means (Genolini et al., 2016) with a timescale parameter of 0.1 giving five times more importance to shape than to the quantity of nodes infested. We obtained a partitioning where each class contained branches whose trajectories had similar shapes whatever the time lag between them. The classification was repeated one hundred times with the random choice of initial cluster centres, and within this framework the partition most frequently met was selected. The independence of classes for the number of berries in the branch was analysed with the

Kruskal-Wallis non-parametric test. The description of the composition of the classes, and the mean trajectories led to a hypothesis about the development of the infestations. The hypothesis was tested using the Friedman test and an analysis of variance. All analyses were done using R version 2.5 (R Core Team, 2016). The classification method was implemented using the R “kmlShape” package (Genolini, 2016).

Results

Number of attacked berries at the beginning and end of the trials. The number of berries per branch was not significantly different between treatments at the beginning and at the end of the experiment (Table 1). At the beginning, there were 15.4 berries per node, on average. The treatments varied from 77 to 74 berries per branch, on average, between week 1 and week 10. There were fewer berries at the end of the trial than at the beginning. Regarding the level of infestation, the number of attacked berries per branch varied from 0 to 1.5 at the beginning. The number of attacked berries then increased significantly up to the end of the trial, with the exception of the treatment with tulle used against any external CBB attacks.

The number of infested berries in the six treatments was not significantly different ($p = 0.06$) at the end of the experiment, although the final number of infested nodes and average percentage of attacked berries were higher in the Net-Glue-Infested treatment than in the treatment initially free of infestation (Table 1). We did not find any females trapped on the inter-node spaces of branches previously coated with glue (i.e., Glue-infested, Glue-Initially free of infestation and Net-Glue-Infested treatments). Attacks on Glue-Infested and Glue-Initially free of Infestation treatments were not significantly different at the end of the experiment. In addition, it is important to note that the attack rates were from 2.2 to 8.3% at the end of the experiment, which were considered moderate because they were located at the start of new fruiting development.

Dynamics of node infestation. The curves of the trajectories that reflected the number of infested nodes per branch enabled four classes to be defined (Fig. 2). This classification was achieved with 35% of the replications. The first class (red) had almost flat trajectories, containing branches with few attacks, principally Control-Initially free of Infestation and Glue-Initially free of Infestation branches, initially free of CBB attacks (14/21), along with

some branches of the Glue-Infested treatment (4/21). The second class (green) contained the branches whose number of infested nodes increased rapidly in two growth steps around weeks three and six. Half of the Net-Glue-Infested treatment was in this class (8/15). The third class (dark blue) had a similar shape to class two (green) with two steps of node infestation but reaching a lower level of attack. This class included the Control-Infested, Glue-Infested (12/18) and Control-Initially free of Infestation treatments (5/18). For the second and third classes, a decrease was observed after each increase. The fourth class (light blue) presented only one peak that included some branches of all the treatments.

Dynamics of berry infestation. The trajectories per branch of the attacked berries per infested node were grouped into three classes (Fig. 3). This classification was achieved with 18% of the replications. The first class (green) had a mean trajectory that was almost flat, grouping the branches for which the number of attacked berries per infested node grew slowly, including the Control-Initially free of Infestation and Glue-Initially free of Infestation (20/29) treatments. The second class (dark blue) represented trajectories with a peak, which clustered the branches for which the number of attacked berries per infested node grew rapidly, including a majority of infested treatments (12/16). The third class (red) had an intermediate trajectory that grouped the branches for which the number of attacked berries per infested node increased before weeks three and six, and then stabilized. These branches belonged to the Control-Infested, Glue-Infested and Net-Glue-Infested treatments (24/30).

Differences in infestation dynamics between treatments. Graphic representation of the classes of infestation dynamics for nodes and berries (Table 2) indicated that, 1) The number of infested nodes on protected branches (Net-Glue-Infested) was significantly higher than the number of nodes on unprotected branches (Glue-Infested) in weeks five and six. However, the number of attacked berries per node was not different in both treatments, 2) The number of infested nodes was significantly larger on infested branches than on branches free of infestation up to the eighth week. However, the number of attacked berries per attacked node was not significantly different with or without initial infestation, 3) The final number of attacked berries per node was not different on glue or

control type branches except on one date for node infestation, 4) The final number of attacked berries per node was not correlated to the initial number of berries ($R^2 = -0.09$). The initial number of berries per branch was not related to the classes of infestation dynamics for nodes ($X^2 = 3.0$; $df = 3$; $p = 0.4$) or berries ($X^2 = 2.9$; $df = 2$; $p = 0.2$).

Discussion

CBB dispersal. In this study, infestation dynamics were studied for nine weeks of the fruiting period on a branch scale on several coffee trees with suitable berries for CBB and already infested by *H. hampei*. Under those conditions, we demonstrated that the number of berries was uniform on the branches for all the treatments and that the number of attacked berries per branch increased over time, except on branches that were initially free of infestation and protected with tulle (absolute control). During this study, infested berries increased from 0 to 2.5 per branch in the Control-Initially free of Infestation treatment, and from 1.3 to 3.1 in the Control-Infested treatment (Table 1). If the rate of attack appeared moderate at the end of the study (between 2.2% and 8.3%) it is because the infestations of new berries by *H. hampei* were beginning. As already known, the levels of CBB infestation can continue to rise until the harvest (Guzmán et al., 1997).

Several combined classes were defined for CBB infestation dynamics: classes for infested nodes per branch and classes for infested berries per node. The first classes showed one or two expansion phases or peaks separated by approximately four weeks (Fig. 2). The top of the two peaks could be interpreted as the beginning of two periods of abundant fall of infested berries (Borbón-Martínez, 1989; Contreras et al., 2007; Teixeira et al., 2006). One class presented a clear expansion phase. It grouped some of the initially infested branches. By contrast, the dynamics of berry infestation per node was not so clear. Only one class presented a distinct expansion phase. It grouped some of the initially infested branches. The average period of the peak was between weeks three and four. Although the number of berries per node was high (15.4, on average), the final number of attacked berries per infested node was low (2.2, on average). This level could be explained by the falling of many infested berries during the expansion phase (Fig. 3) (Teixeira et al., 2006). It should also be added that berry fall might explain the decrease in node infestation after the peaks (Fig. 2). The fall was due to physiological weakening

of berries under the effect of more or less deep perforations (Borbón-Martínez, 1989). Consequently, such berries which will eventually deteriorate on the ground are part of the crop losses associated with *H. hampei* infestations. We know that the emergence of females leads to a reinforcing of attacks on healthy berries during ripening and to an increase in the infestation level up to the harvest (Teixeira et al., 2006). This study of infestation dynamics at branch level during the fruiting season was totally different from what is observed in the inter-harvest period when females emerge from residual berries searching for scarce new berries, which leads to further dispersal (Mathieu et al., 1997; Dufour et al., 2000). Indeed, during the fruiting period up to the harvest, step-by-step dispersal is facilitated by the abundance of suitable berries on the branches.

CBB spreads by flying rather than walking. In this study, we examined the displacement mode associated with colonization dynamics. Walking is an activity that CBB performs naturally; for instance, this behaviour is observed in CBB breeding installations (Mathieu et al., 1997), when recently emerged females try to get out, or in olfactometers where females move towards the attractant source (Giordanengo et al., 1993). It is therefore possible that a CBB female could walk from one node to another. However, no CBB were trapped on the glue-coated branches protected with tulle and glue-coated branches exposed to colonizing females from different origins, while numerous nodes were infested over time (Table 1). This suggests an absence of displacement by walking. In addition, we showed that the presence or absence of glue did not modify the result of the node infestation process (Table 1). Differences were only significant on one date (Table 2). Thus, the absence of displacement by walking was not the consequence of a repulsive effect on the CBB caused by the glue, which confirms the safety of glue and the predisposition of *H. hampei* to use flight as a mechanism of dispersing from one node to another. Therefore, in the fruiting season, CBB do not colonize by walking but by flying, although it is quite capable of moving in that way. The origin of this behaviour was uncertain at the time when coffee trees were not cultivated, and plants grew naturally with low productivity (Tisserant, 1929). It is possible that the colonization of more or less isolated nodes made CBB displacement by flight compulsory.

CBB disperses over different distances. The average number of infested nodes per branch and infested berries per node, with or without tulle protection, showed no

significant difference between Glue-Infested and Net-Glue-Infested treatments, from week one to week four (Table 2). Despite the opportunity for CBB to fly out of the Glue-Infested branches or to colonize them, the infestation level remained similar. CBB stayed close to the berry from which they emerged or to the nodes in the immediate vicinity. So, in the first four weeks for Control-Infested and Glue-Infested treatments, it seemed that *H. hampei* mainly dispersed to colonize nodes and berries on the same branch (Fig. 2 and 3). After that, there was a phase of dispersal away from the branch: in weeks 5 and 6, the nodes of Net-Glue-Infested branches were more infested than Glue-Infested branches, because the tulle protection prevented CBB from flying away from the branch (Table 2). On that date, only a small share of berries and nodes were attacked, suggesting that wider dispersal of CBB can occur despite fruit availability nearby. A previous study showed that there is a correlation between the percentage of berries attacked and the total number of berries at a given time (Ticheler, 1961).

CBB dispersal driven by previous CBB infestation. The results showed that the number of infested nodes per branch without tulle protection was significantly larger up to the ninth week when the first node was previously infested (Table 2). This means that early infestation was conducive to node infestation dynamics. By contrast, the number of attacked berries per infested branch did not depend on the initial status (Table 2), but it seemed to be subject to strong fluctuations caused by infested berry fall.

Several studies on the dynamics of CBB populations in the tropics have shown how groups of colonizing females emerge and fly from the residual coffee berries during the inter-harvest period. They can produce substantial migration peaks before dispersing around the place of emergence up to several metres or tens of metres away (Dufour et al., 1999, 2000; Leplay, 1928). On the other hand, we observed that in the fruiting period, the emergence of females was prolonged over time, that migrations were of small amplitude and that dispersal took place over short distances within each coffee tree. We demonstrated that CBB do not walk but fly, even over short distances and that dispersal occurs in two steps at the beginning of the fruiting season: 1) intra-branch dispersal during which CBB colonize nodes and berries step by step, 2) inter-branch dispersal which extends the operational range within the coffee trees.

The increase in coffee berry production during the fruiting season generates strong attraction which directs CBB to the berries. Thus, there is a real problem for CBB control, especially for trapping with semiochemicals whose attractiveness seems insufficient to divert CBB from its natural host. This explains why trapping has not been effective at this period and has not been performed under these climatic conditions. However, our results prompt us to explore new strategies for CBB control during fruiting. Lastly, it is possible to study the influence of coffee architecture, densities and planting systems on infestation dynamics in order to identify new integrated protection strategies against CBB. Consequently, in an environment conducive to the development of *Beauveria bassiana*, that entomopathogen should be used during intra-branch colonization to limit the expansion of the pest. In addition, the attractant potential of traps should also be improved and the trapping system should be optimized in order to attract CBB more efficiently during inter-branch colonization.

Acknowledgments

We would like to thank Enrique López of ECOSUR, for his technical contribution. We also thank Peter Biggins for his valuable help in revising the English of this paper. Lastly, we thank the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) for financial support to A.K.R.R. through the doctoral scholarship (grant number 777606C).

References

- Baker, P.S.** (1984) Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomol. Mexicana*, **61**, 9-24.
- Baker, P.S.** (1999) The coffee berry borer in Colombia. Final report of the DFID-CENICAFE-CABI Bioscience IPM for coffee project. Baker P.S. (ed), Chinchiná (Colombia), 144 p.
- Baker, P.S., Ley, C., Balbuena, R. & Barrera, J.F.** (1992) Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* **82**, 145-150.

- Barrera, J.F.** (1984) Dynamique des populations du scolyte des fruits du caféier, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae, et lutte biologique avec le parasitoïde *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethylidae), au Chiapas, Mexique. Thèse doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 301 p.
- Barrera, J.F., Herrera, J., Villacorta, A., García, H. & Cruz-López, L.** (2006) Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei* pp. 71-83 in Barrera, J.F. & Montoya, P. (Eds.) Simposio sobre trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica. Sociedad Mexicana de Entomología y ECOSUR.
- Borbón-Martínez, O.** (1989) Bioécologie d'un ravageur des baies de caféier, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera : Scolytidae) et de ses parasitoïdes au Togo. Thèse doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 185 p.
- Bustillo, A.E., Bernal, M.G., Benavides, P. & Chaves, B.** (1998) Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infesting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist **82**, 491-498.
- Contreras, T. & Camilo, J.E.** (2007) Situación de la broca del café en República Dominicana pp. 43-55 in Barrera, J.F., García, A., Domínguez, V. & Luna, C. (Eds.) *Memoria del Workshop Internacional "La Broca del Café en América Tropical: Hallazgos y Enfoques"* organized by the Sociedad Mexicana de Entomología y ECOSUR, Guerrero, México, junio 2007, Acapulco, Sociedad Mexicana de Entomología y ECOSUR.
- Damon, A.** (2000) A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research **90**, 453-465.
- Dufour, B.P., Barrera, J.F. & Decazy, B.** (1999). La broca de los frutos del cafeto: la lucha biológica como solución? Pp. 293-325 in Bertrand, B. & Rapidel, B. (Eds.) "Desafíos de la Caficultura en Centroamérica". IICA, San Jose.
- Dufour, B.P., González, M.O. & Frérot B.** (2000) Piégeage de masse du scolyte du café *Hypothenemus hampei* Ferr. (Col., Scolytidae) en conditions réelles: premiers résultats pp. 480-491, in *Proceedings of XVIII colloque international sur la science*

du café organized by the ASIC, Paris, Helsinki, Findande, 2-8 août 1999, Paris, ASIC.

- Dufour, B.P. & Frérot, B.** (2008) Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col. Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. Journal of Applied Entomology **132**, 591-600.
- Genolini, C.** (2016) kmlShape: K-Means for Longitudinal Data using Shape-Respecting Distance. R package version 0.9.5. <https://CRAN.R-project.org/package=kmlSape>.
- Genolini, C., Ecochard, R., Benghezal, M., Driss, T., Andrieu, S., & Subtil, F.** (2016). kmlShape: An Efficient Method to Cluster Longitudinal Data (Time-Series) According to their Shapes. PloS one, 11, e0150738.
- Giordanengo, P., Brun, L.O. & Frérot, B.** (1993) Evidence for allelochemical attraction of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by coffee berries. Journal of Chemical. Ecology **19**, 763-769.
- Guzmán, R., Castillo, M. & López, L.**, 1997. Fluctuación poblacional de la broca del grano del cafeto (*Hypothenemus hampei* Ferr) en dos zonas cafetaleras de la República Dominicana, pp 303-316 in Memorias del XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA/PROMECAFE, ICAFE, San José, Costa Rica, IICA/PROMECAFE (Ed) Tegucigalpa, Honduras.
- Le Pelley, R.H.** (1968) The pests of coffee. Ed. Longmans, London, 590 p.
- Leplae, E.** (1928) Le scolyte des baies du caféier (*Stephanoderes*). Bulletin Agricole du Congo Belge **19**, 271–276.
- López-Guillén, G., Valdez-Carrasco, J., Cruz-López, L., Barrera, J.F., Malo, E.A. & Rojas, J.C.** (2011) Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. Environmental Entomology **40**, 441-448.
- Mansingh, A.** (1991) Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. Journal of Coffee Research **21**, 67-98.
- Mathieu, F., Brun, L.O. & Frérot, B.** (1997) Factors related with native host abandon by the coffee berry borer (Ferr.) (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomology **121**, 175-180.

- Mathieu, F., Gaudichon, V., Brun, L.O. & Frérot, B.** (2001) Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. *Physiological Entomology* **26**, 189–193.
- Pereira, A.E., Vilela, E.F., Tinoco, R.S., de Lima, O.G., Kantine, A.K., Morais, E.G.F. & Franc, C.F.M.** (2011) Correlation between numbers captured and infestation levels of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*: A preliminary basis for an action threshold using baited traps. *International Journal of Pest Management* **58**, 183–190.
- R Core Team** (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Silva da, W.D., Moreira, C.C. & Bento, J.M.S.** (2014) How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit? *Journal of Insect Behavior* **27**, 729-735.
- Teixeira, C.A.D., Souza, O. (de) & Costa, J.N.M.** (2006) Frutos de café « Conilon » brocados por *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): Qual a importância de sua queda no decorrer da fase de frutificação? *Neotropical Entomology* **35**, 390-394.
- Ticheler, J.** (1961) Etude analytique de l'épidémiologie du scolyte des graines de café, *Stephanoderes hampei* Ferr, en Côte d'Ivoire. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* **61**, 1-49.
- Tisserant, C.** (1929). Les caféiers sauvages de l'Oubangui français. *Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Coloniale* **9**, 27-30.
- Vega, E.F., Infante, F. & Johnson, A.J.** (2015) The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer, pp 427-494, in Vega, F.E. & Hofstetter, R.W. (Eds.) *Bark Beetles Biology and Ecology of Native and Invasive Species*, Oxford UK.
- Waterhouse, D.F. & Norris, K.R.** (1989) *Hypothenemus hampei* (Ferrari), Coleoptera: Scolytidae, coffee berry borer pp. 57-75, in *Biological Control Pacific Prospects-Supplement 1*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Wrigley, G.** (1988) *Coffee*. Longman Scientific & Technical, Essex, England, 639 pp.

Figures.

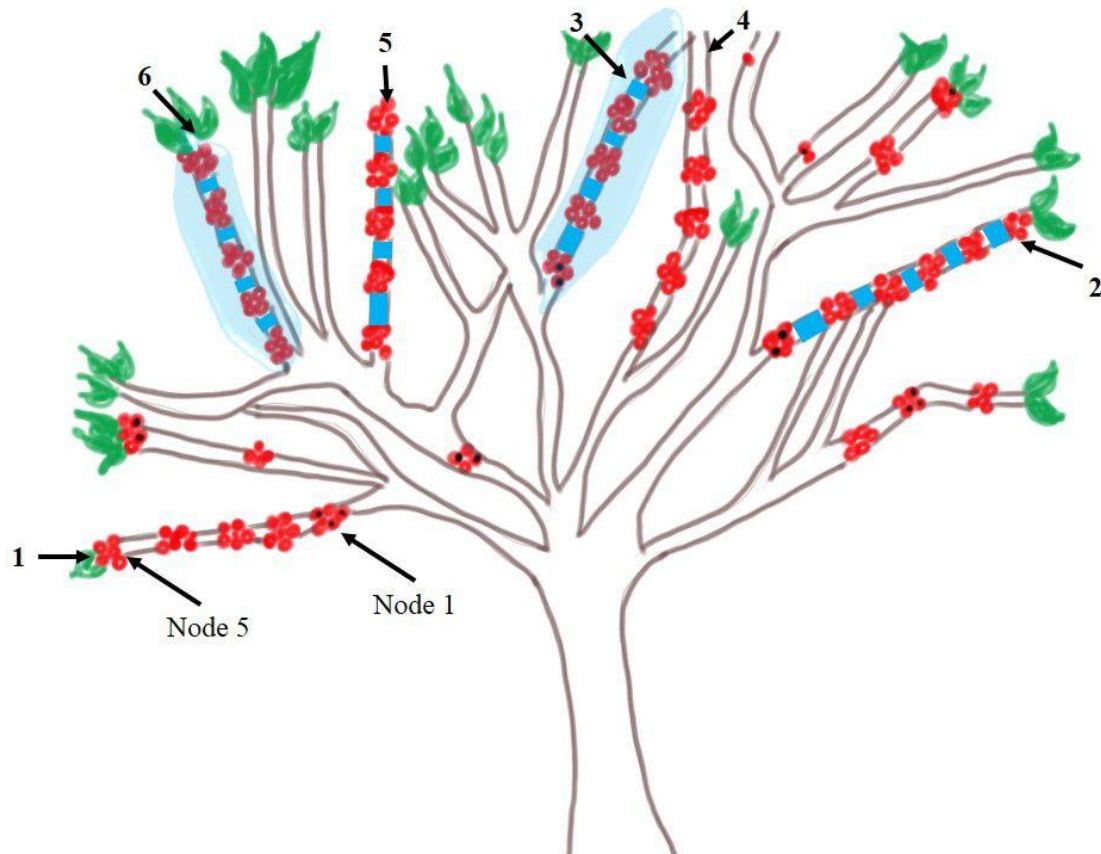


Fig. 1. Design of applied treatments. 1) Without glue and protection + first node infested (control); 2) Application of glue between nodes + first node infested; 3) Application of glue between nodes and complete protection of the branch with tulle + first node infested; 4) Without glue and protection + initially free of infestation (control); 5) Application of glue between nodes + initially free of infestation; 6) Application of glue between nodes and complete protection of the branch with tulle + initially free of infestation (absolute control).

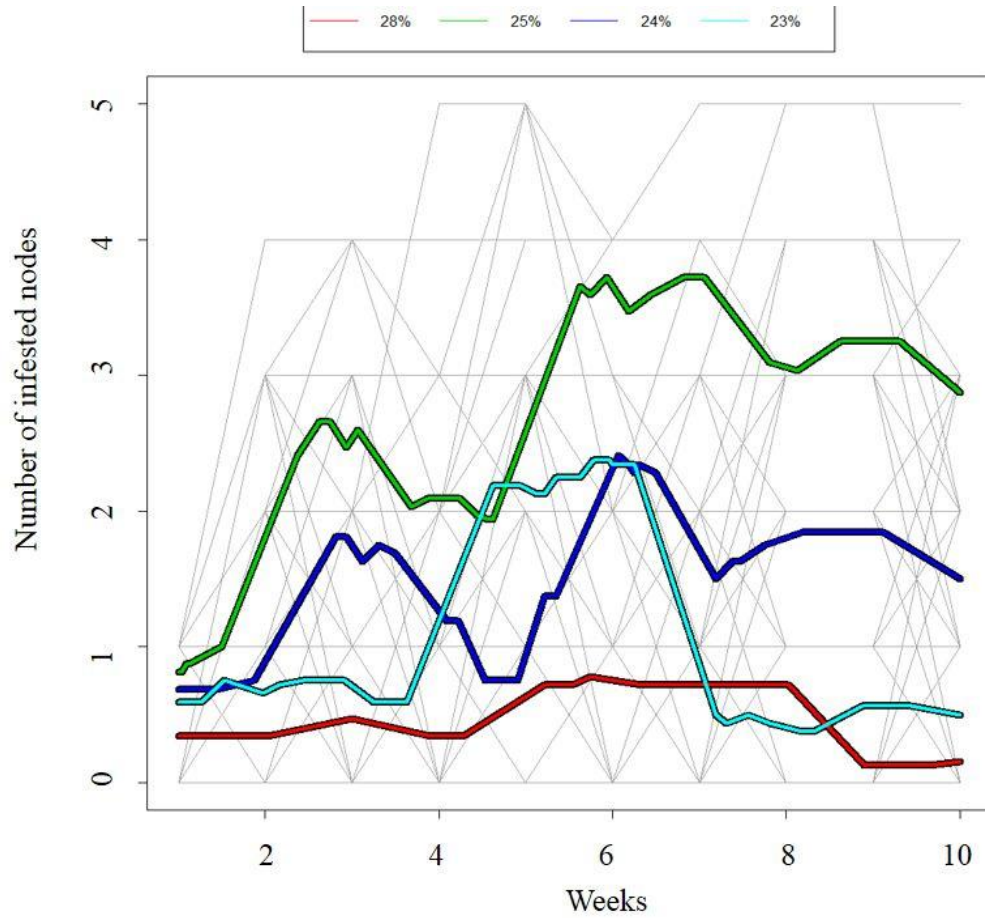


Fig. 2. Mean trajectories for classes obtained by the kmlShape method for infested nodes per branch over nine weeks with individual branch trajectories. Trajectories are grouped giving more importance to shape than to the quantity of nodes infested on the same date. The number of branches in each class is given as a percentage of total branches.

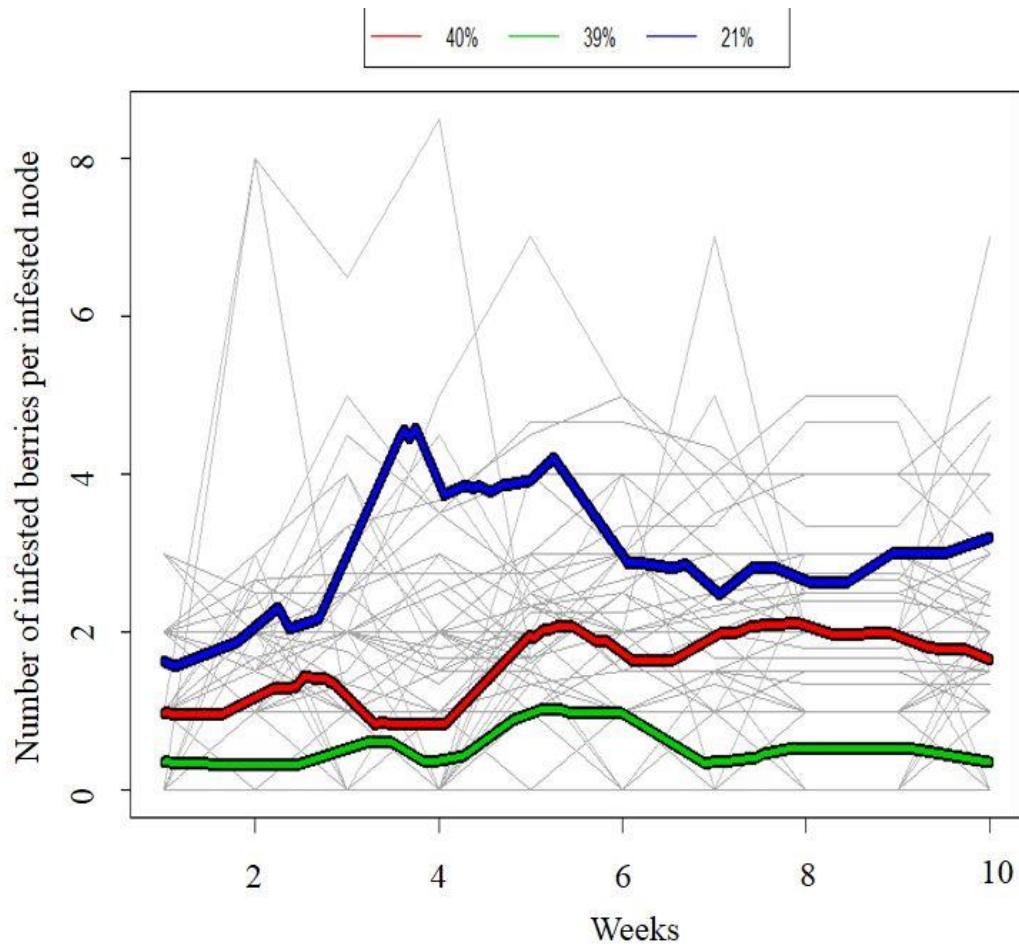


Fig. 3. Mean trajectories for classes obtained by the kmlShape method for infested berries per node per branch over nine weeks with individual branch trajectories. Trajectories are grouped giving more importance to shape than to the quantity of nodes infested on the same date. The number of branches in each class is given as a percentage of total branches.

Tables.

Table 1. Average values of infestation-free berries, infested berries and nodes per branch and treatment, at the beginning and the end of the experiment. * NS = not significant at 5%; Means with the same letter are not significantly different. (Number) data with the same numbers were analysed in the same test.

Treatment	Initial average number of berries per branch	Final average number of berries per branch	Initial average number of attacked berries per branch	Final average number of attacked berries per branch	Initial average number of infested nodes per branch	Final average number of infested nodes per branch	Initial average percentage of attacked berries (%)	Final average percentage of attacked berries (%)	Final average number of attacked berries per infested node
Control-Initially free of infestation	73 a (1)	75 a (1)	0	2.5 a	0	0.9 b * (2)	0	3.9 b (2)	2.6 a (4)
Control-Infested	70 a (1)	68 a (1)	1.3 a	3.1 a	1	1.4 ab (2)	2.2 a	6.2 ab (2)	2.2 a (4)
Glue-Initially free of infestation	78 a (1)	78 a (1)	0.0 (3)	1.7 a (3)	0 (3)	0.7 b (3) (2)	0 (3)	2.2 b (3) (2)	2.2 a (3)
Glue-Infested	85 a (1)	81 a (1)	1.4 a (3)	2.5 a (3)	1 (3)	1.3 ab (3) (2)	1.7 a (3)	3.5 ab (3) (2)	2.0 a (3)
Net-Glue-Initially free of infestation	85 a (1)	73 a (1)	0	0	0	0 (2)	0	0 (2)	0 (4)
Net-Glue-Infested	73 a (1)	72 a (1)	1.5 a	4.6 a	1	2.0 a (2)	2.5 a	8.3 a (2)	2.1 a (4)
Mean \pm standard error	77 \pm 3.1	74 \pm 2.8	0.7 \pm 0.09	2.4 \pm 0.36	0.5 \pm 0.05	1.0 \pm 0.13	1.1 \pm 0.14	4.0 \pm 0.68	2.2 \pm 0.18
Friedman test using the 6 treatments	P<0.05	P<0.05	-	-	-	-	-	-	-
Friedman test using the 3 infested treatments	-	-	P<0.05	-	-	-	P<0.05	-	-
Friedman test using 5 treatments (without the Net-Glue-Initially free of infestation treatment)	-	-	-	P<0.05	-	p=0.03	-	p= 0.046	P<0.05

Table 2. Average values for attacked nodes per branch and attacked berries per attacked node on each date and significance of the Friedman test for the 3 hypotheses built from the classification of infestation dynamics. *NS = Not significant at level $p=0.05$; S = Significant, ** On this date, there was high variability between branches of the same treatment due to the small number of infested nodes.

Hypothesis		Date	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1 With or without net	Treatment	average number of attacked nodes per branch											
	Net-Glue-Infested	1.0	1.9	2.3	2.0	2.6 a	2.2 a	2.2	2.3	2.3	2.0		
	Glue-Infested	1.0	1.5	1.5	1.3	1.6 b	1.3 b	1.5	1.7	1.7	1.3		
	Friedman test	NS*	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	NS	NS		
	Treatment	average number of attacked berries per attacked node											
	Net-Glue-Infested	1.5	2.1	2.1	1.9	1.9	2.6	2.2	2.3	2.3	2.1		
	Glue-Infested	1.4	1.5	1.9	2.1	2.1	2.0	2.1	1.9	1.9	2.0		
	Friedman test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
2 Initial state: free of infestation or infested	Treatment	average number of attacked nodes per branch											
	Control- Initially free of infestation Glue-Initially free of infestation	0 b	0.5 b	0.7 b	0.4 b	1.1 b	0.8 b	0.9 b	1.1 b	1.1 b	0.8		
	Control-Infested Glue-Infested	1 a	1.6 a	1.6 a	1.4 a	1.9 a	1.5 a	1.7 a	1.9 a	1.9 a	1.3		
	Friedman test	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NS		
	Treatment	average number of attacked berries per attacked node											
	Control-Initially free of infestation Glue-Initially free of infestation	-	2.4	2.1	2.9	2.0	1.9	2.2	1.5	1.5	2.4		
	Control-Infested Glue-Infested	1.4	1.6	1.7	2.0	2.1	1.8	1.9	2.1	2.1	2.1		
	Friedman test	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
3 With or without glue	Free of infestation	Treatment	average number of attacked nodes per branch										
		Control-Initially free of infestation	0.0	0.5	0.6	0.4	0.9	0.6	1.1 a	1.1	1.1	0.9	
		Glue-Initially free of infestation	0.0	0.5	0.7	0.3	1.2	0.9	0.7 b	1.1	1.1	0.7	
		Friedman test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	
	Infested	Treatment	average number of attacked nodes per branch										
		Control-Infested	1.0	1.7	1.8	1.5	2.3 a	1.8	1.9	2.1	2.1	1.4	
		Glue-Infested	1.0	1.5	1.5	1.3	1.6 b	1.3	1.5	1.7	1.7	1.3	
		Friedman test	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	
	Treatment	average number of attacked berries per attacked node											

	Free of infestation	Control-Initially free of infestation	-	3.5	2.4	3.8	2.0	1.8	2.3	1.3	1.3	2.6
		Glue-Initially free of infestation	-	1.6	1.9	2.1	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	2.2
		Friedman test	-	NS**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Infested	Treatment	average number of attacked berries per attacked node									
		Control-Infested	1.3	1.7	1.5	1.8	2.0	1.6	1.8	2.2	2.2	2.2
		Glue-Infested	1.4	1.5	1.9	2.1	2.1	2.0	2.1	1.9	1.9	2.0
		Friedman test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

CAPÍTULO 5

Discusión y Conclusiones

5.1. Discusión General

Uno de los procesos vitales en la bioecología de *H. hampei* es la dispersión de las hembras colonizadoras, pues la multiplicación de la especie depende de que éstas sobrevivan a los diversos factores abióticos y bióticos con los que interactuarán durante el proceso de búsqueda de frutos hospederos. Sin embargo, se ha puesto poco énfasis en determinar la capacidad de dispersión del insecto y los factores que la afectan. El presente trabajo es uno de los pocos que existen en la literatura, como los de Acebedo-Beyona et al. (2009) y Olivas et al. (2010), que se han enfocado explícitamente al estudio de la dispersión de *H. hampei*. En gran medida, la dificultad para determinar el sitio de reposo de un insecto tan pequeño como la broca del café después de abandonar el fruto donde se desarrolló, ha sido una de las causas principales, para estudiar su dispersión. Un paso importante en el estudio de dispersión se dio con el desarrollo del trampeo de la broca con atrayentes de metanol-etanol a partir de la década de 1990 (Barrera et al. 2006). No obstante, para realizar algunos estudios de esta investigación fue necesario desarrollar técnicas específicas como el marcaje de las brocas colonizadoras, como propiciar el vuelo y determinar el estado de apareamiento de las hembras colonizadoras. En esta investigación se confirmaron algunos hallazgos citados en la literatura que requerían tener mayor precisión para aportar nuevo conocimiento sobre la dispersión de *H. hampei* bajo las condiciones del Soconusco, Chiapas, México.

Como punto de partida del estudio de la dispersión de *H. hampei*, durante un año se llevó a cabo el trampeo de las hembras colonizadoras con trampas cebadas con la mezcla de metanol-etanol, que actualmente se utiliza en el monitoreo y trampeo masivo de esta plaga (Barrera et al. 2006). Se encontró que las mayores capturas se registraron de febrero a junio, que corresponde al periodo inter cosecha, registrándose dos picos de actividad, ambos relacionados con la ocurrencia de lluvias intensas (40 y 54.4 mm de precipitación), que coincidió con lo reportado por Barrera et al. (2004), para esta región, y confirmando que el efecto de la lluvia es un factor que promueve la emergencia masiva de la broca (Baker 1984; Baker et al. 1992; Baker et al. 1994).

De acuerdo con la información disponible (Le Pelley, 1973), cuando las hembras emergen del fruto ya se habían apareado con sus hermanos, propiciando un alto grado de endogamia; estudios subsecuentes realizados por López (1993), indicaron que cierta fracción de esas hembras eran vírgenes, lo que explicó el problema de la endogamia, debido a que tenían posibilidad de aparearse con sus conespecíficos machos presentes en otros frutos. A través de las investigaciones realizadas en este trabajo, se desarrolló una técnica de tinción para identificar la morfología del complejo espermático de *H. hampei*, iniciando los primeros estudios por Rubio et al. (2008), y continuaron con la determinación de cómo es afectada la inseminación por factores como la edad, apareamiento y alimentación (Silva et al. 2014). En el caso de esta tesis, dichas técnicas mostraron que el sistema reproductor de la broca tiene similitud con aquellos descritos para otras especies de escolitinos como *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Bleiker et al., 2013), *D. frontalis* Zimmermann (Armendariz-Toledano et al., 2014) e *Ips typographus* (L.) (Hallberg, 1983). Con el desarrollo de esta técnica se reconoce y describe el espermatozoide de *H. hampei*, y hasta donde se sabe, es la primera en llevarse a cabo; al respecto, fue interesante corroborar que la morfología de los espermatozoides de la broca es semejante a la de ciertos dípteros como *Aedes aegypti* (L.) (Pascini et al., 2012) y *Drosophila bifurca* Patterson y Wheeler (Pitnick et al., 2009). Con el desarrollo de esta técnica se reconoció de manera rápida y confiable, la ausencia o presencia de espermatozoides en la espermateca y el estado de apareamiento de muestras de hembras colonizadoras. Además, identificar una inseminación reciente, y con ello, diferenciar a las hembras colonizadoras jóvenes de las más viejas, que representaron 98.5% y 1.5% respectivamente, de la población atrapada en las trampas durante el periodo inter cosecha. Estos resultados muestran que conocer el complejo espermático de *H. hampei* proporciona información vital para determinar el estado reproductivo de las hembras colonizadoras y su relación con la fenología del cultivo. Aún restan por aclarar algunas interrogantes como confirmar la naturaleza glandular del órgano identificado aquí por primera vez como glándula espermática; o bien, confirmar la posible función de la secreción traslúcida observada en las espermatecas de las hembras vírgenes como conservadora de la viabilidad del espermatozoide. Sin embargo, el conocimiento que se tiene

ahora del aparato reproductor femenino y masculino de la broca será de mucha utilidad en el estudio de su dispersión.

Asimismo, estas técnicas de tinción de la espermateca y los espermatozoides, permitieron diferenciar con bastante precisión las hembras de broca del café inseminadas con respecto a las vírgenes. De tal manera que los resultados confirmaron que toda la población de las hembras colonizadoras se habían apareado antes de abandonar los frutos. En este sentido, las técnicas de tinción celular con los colorantes Giemsa y negro clorazol descritas en este trabajo, representan una contribución metodológica importante para abordar problemas relacionados con la biología reproductiva de la broca del café. Sin embargo, más estudios deben realizarse para averiguar el mecanismo que permite a *H. hampei* resolver el problema que implica la endogamia (Gauthier 2010).

Un resultado controversial de la broca del café ha sido su capacidad de vuelo, que ha sido catalogada como limitada. Sin embargo, Baker (1984) demostró en laboratorio que *H. hampei* exhibe un fino control del vuelo, con una tendencia a flotar y avanzar lentamente, con un vuelo continuo por un periodo mayor a 22 min y hasta 3 h en vuelos sucesivos; según este autor, los insectos que vuelan bien en condiciones de laboratorio también lo pueden hacer en condiciones de campo, este hecho indica que es un buen volador. No se encontró que las hembras colonizadoras adheridas al pegamento colocado entre dos glomérulos de frutos. Se infirió que las hembras colonizadoras abordan “volando –y no “caminando” (a través de las ramas)– a frutos que van a infestar. Por ello, el desplazamiento por vuelo de las hembras colonizadoras de un fruto a otros localizados en otros glomérulos, ramas o plantas de café.

Se demostró que las hembras inseminadas fueron más aptas el vuelo que las hembras extraídas manualmente de los frutos infestados. Esto indica la importancia de mejorar el control de la broca con trampas cebadas con atrayente, para incrementar una mayor captura de hembras colonizadoras. Aunque este hecho ya había sido observado empíricamente, hasta que fue demostrado en este estudio. Además, se confirmó que una vez que la broca colonizó un fruto, también pierde la capacidad de vuelo debido a que hay un debilitamiento de los músculos alares como resultados de la producción y maduración de huevos (Ticheler 1961; Baker 1984; López-Guillén et al. 2011). Se

determinó que una vez que la broca del café coloniza un fruto, también pierde su capacidad de vuelo de manera paulatina en el transcurso de 5 a 6 días, lo que indica, que la broca colonizadora podría ser capaz de abandonar un fruto inviable y buscar otro que sea un buen hospedero para su multiplicación. Pero, debido a que se encontró que las hembras que tuvieron contacto con frutos verdes (endospermo no consistente, de acuerdo con Barrera-Gaytán, 1994), no volaron durante el desarrollo de los experimentos, lo que sugiere la necesidad de profundizar más en el conocimiento de la degradación de los músculos alares en relación al contacto con el fruto de café (López-Guillén et al. 2011).

Los estudios realizados en esta investigación sugieren que las brocas sobreviven un mayor tiempo en ambientes mojados (20 días) que en ambientes secos (7-10 días), lo que sugiere que la broca puede beber agua del ambiente como ocurre en otros insectos (Parra, 2012; Douglas, 2013; Dow, 2013), lo que evita que mueran por deshidratación e incrementar la probabilidad de encontrar un hospedero viable.

Con respecto a el papel que juegan los refugios temporales, en el supuesto que la broca debe descansar, guarecerse del clima adverso mientras no encuentra frutos viables, los experimentos realizados para determinar el papel de los sitios de refugio sugieren que ciertos materiales existentes en el cafetal como *R. communis*, *C. maypurensis*, *C. cajan*, *Nectandra* spp, pedúnculo y hojarasca de *Coffea* sp, pueden proveer un buen refugio para las hembras colonizadoras; dado, que los insectos utilizados en este experimento sobrevivieron hasta 16 días en los frutos de *Recinus communis* L. (Euphorbiaceae), *Cajanus cajan* (L.) Huth y *Crotalaria* sp. (Fabaceae) con respecto al control (sin refugio) donde sobrevivieron 11 días, pero en ningún caso hubo oviposición, incluso en *C. cajan* citado como hospedera primaria de *H. hampei* por Campos-Almengor (1981). Estos resultados, considerados como una contribución, complementan la lista de plantas de las familias Euphorbiaceae y Fabaceae reportadas para este insecto como refugio temporal (Barrera 2012). Por lo tanto, en ausencia de frutos de café se considera que el uso de este tipo de refugios, y el acceso a fuentes de agua antes mencionado, podrían mejorar la sobrevivencia de la broca y representar un elemento positivo para garantizar el éxito en la dispersión, localización de un hospedero viable y colonización, sobre todo a largas distancias.

En este sentido, para estudiar la dispersión a larga distancia, se requirió desarrollar varias técnicas que permitieran marcar, liberar y capturar “números grandes” (p.e. 4000 individuos/día) de hembras colonizadoras. Aunado, la simulación del “efecto disparador” de la lluvia sobre la emergencia masiva de este insecto en condiciones de campo y que utilizaron Baker (1984) y Barrera-Gaytán (1994) en sus investigaciones, contar con suficientes hembras colonizadoras y marcadores cuticulares que no provocaron efectos indeseables sobre los insectos como mortalidad de los individuos, pérdida de marcaje o interferencia en la capacidad de vuelo, fueron cruciales para el desarrollo de dicho estudio (Haglar y Jackson, 2001). En este trabajo se encontró que, los polvos fluorescentes utilizados presentaron características idóneas para realizar el estudio de la dispersión espacial por medio de la técnica de marcaje-liberación-captura, ya que el colorante no interfirió en la sobrevivencia o capacidad de vuelo del insecto, y el polvo permaneció adherido a la cutícula de los insectos por más de 21 días en condiciones secas y de 3 a 4 días en condiciones húmedas. Resultados similares reportaron Acebedo et al. (2009) usando un colorante de la misma marca para el estudio de la dispersión de la broca en Colombia.

Para facilitar el vuelo de las hembras marcadas se diseñó una plataforma de despegue con capacidad de colocar hasta 500 individuos cada 20 min, que facilitó el vuelo de prácticamente todos los individuos utilizados en las liberaciones. Al liberar las hembras marcadas, una menor cantidad fueron capturadas en las trampas o dejaron rastros en el sitio experimental, situación similar a la observada durante el desarrollo de la técnica de inducción de vuelo. Se presume que parte de las hembras se dirigieron a lugares inaccesibles para su captura como a los estratos más altos sobre el nivel del suelo de los sitios aledaños al área de estudio, como se reporta en la literatura (Mathieu et al. 1997; Barrera et al. 2006; Dufour y Frérot 2008).

Las evaluaciones preliminares realizadas sobre el marcaje-liberación-captura permitieron ubicar las trampas BROCAP® cebadas con atrayente (metanol-etanol en proporción 3:1) en el sitio de estudio. Aunado, los resultados obtenidos en la inducción de emergencia y vuelo de las hembras colonizadoras y con base en la literatura, las evaluaciones se realizaron entre las 16 y 18 h (Roepke 1919; Leefmans 1923; Leroy 1936; Baker et al. 1992; Giordanengo 1992; Borbón-Martínez et al. 2000). Se determinó

que después de 4 a 24 h de haber sido liberadas, *H. hampei* se desplazó mediante vuelo de 3 a 75 m de distancia del punto de liberación, aunque la mayor proporción de capturas se obtuvo en las trampas colocadas entre 10 y 20 m del punto de liberación. Las recapturas –y rastros fluorescentes sobre la vegetación dejados por los insectos marcados– correspondieron aproximadamente al 6% de las hembras liberadas. Resultados similares con respecto a la proporción de individuos recapturados y la disminución de las capturas al incrementar la distancia del punto de liberación fueron reportados en otros escolitinos (Zolubas y Byers 1995; Martay et al. 2014).

A pesar que se ha reportado que esta plaga se puede desplazar a menos de 400 m del punto de liberación y, ocasionalmente, se han capturado individuos a 140 m de los bordes de las plantaciones de café (Baker 1984; Olivas et al. 2010), la mayoría de hembras colonizadoras se dispersan en la periferia de las plantas cuando la disponibilidad de frutos hospederos es mayor (periodo de fructificación) y, hasta una distancia de 10 m a 20 m cuando la disponibilidad de frutos viables es menor (periodo inter cosecha). Un menor número de hembras colonizadoras se dispersaron hasta 75 m de distancia, lo cual indica que algunas hembras son capaces de dispersarse a mayor distancias, pero esto dependerá de otros factores como el estado de fisiológico de los músculos alares, edad, alimentación, utilización de refugios alternos, entre otros (López-Guillén et al. 2011; Silva et al. 2014). Los resultados sobre dispersión presentados en esta investigación, son la primera evidencia sobre el rango de dispersión de las hembras colonizadoras de *H. hampei* durante los periodos de inter cosecha y fructificación. Estos generan conocimiento sobre el tema y representan la base para continuar con el estudio de dispersión espacio-temporal de la broca. A su vez, evidencian la necesidad de mejorar el control etológico de la broca, debido a que su dispersión la realizan volando. Se recomienda continuar con los estudios sobre el estado fisiológico de las hembras colonizadoras, modificar los sistemas de trampeos en cuanto a la difusión de los atrayentes para que sean adecuados a la región y al periodo en el que se implementen.

Aunque todavía hay muchos aspectos que comprender sobre la dispersión de *H. hampei*, como determinar el efecto de diferentes sistemas de producción de café, conocer la importancia de la disposición del paisaje alrededor de las plantaciones o estudiar el

efecto de la variabilidad climática, la información generada en esta tesis puede enriquecer el manejo oportuno y eficiente de esta importante plaga del café.

5.2. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación denominada “Factores que influyen en la dispersión espacio-temporal de broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)”, se establecen las siguientes conclusiones:

5.2.1. La procedencia, periodo de colecta, condiciones de almacenaje y manipulación del material biológico fueron determinantes para disponer de grandes cantidades de insectos con condiciones fisiológicas, morfológicas y reproductivas apropiadas para el estudio de la dispersión espacio-temporal de *H. hampei*.

5.2.2. La espermateca de *H. hampei*, está compuesta por un ducto espermático, músculos espermáticos y una glándula espermática; además, posee músculos al final de su curvatura extrema y su cutícula está finamente reticulada.

5.2.3. Los espermatozoides exhibieron una apariencia de filamentos minúsculos, endebles y homogéneos, congregados longitudinalmente dentro de la espermateca.

5.2.4. Las técnicas de tinción de la espermateca de *H. hampei* con Giemsa y negro clorazol, permitieron diferenciar con rapidez y precisión las espermatecas de hembras inseminadas de las no inseminadas o vírgenes (sin espermatozoides).

5.2.5. Las mayores capturas de hembras colonizadoras de *H. hampei* en trampas cebadas con metanol-etanol (3:1) se presentaron de febrero a junio, es decir, durante el periodo intercosecha; se observaron dos picos de mayor captura, ambos relacionados con la ocurrencia de lluvias intensas.

5.2.6. La inseminación fue una característica inherente de las hembras colonizadoras de *H. hampei* cuando emergieron de frutos residuales.

5.2.7. El agua disponible en estado líquido en el cafetal puede ser bebida por la broca y aumentar sustancialmente su sobrevivencia durante la emergencia masiva de las hembras colonizadoras.

5.2.8. En los cafetales existen órganos vegetativos (frutos, vainas, etc.) que funcionan como refugios temporales que las hembras colonizadoras usan como estrategias de sobrevivencia durante la dispersión en el periodo intercosecha.

5.2.9. Después de colonizar un fruto, la hembra pierde en forma paulatina su capacidad de vuelo, lo que la induce a realizar un segundo vuelo en busca de hospederos si el fruto colonizado no es viable para su reproducción.

5.2.10. El uso de la técnica de marcaje-liberación-captura para analizar la dispersión de *H. hampei*, requiere considerar la pertinencia de los marcadores y el método para reconocer a los insectos marcados.

5.2.11. Mediante el marcaje-liberación-recaptura, las hembras colonizadoras de broca del café se dispersaron hasta 75 m de distancia, 24 h después de liberadas.

5.2.12. Habiendo disponibilidad de hospederos viables, como durante el periodo de fructificación del café, las hembras de *H. hampei* se dispersan a los glomérulos de frutos adyacentes por aire (volando) y no por tierra (caminando sobre las ramas).

Literatura citada

- Acebedo-Bedoya FE, Gil PZN, Bustillo PAE, Montoya REC, Benavides MP. 2009. Evaluación de marcadores físicos y moleculares como herramientas para el estudio de la dispersión de *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé*. 60: 72-85.
- Andreev D, Breilid H, Kirkendall L, Brun LO, Ffrench-Constant RH. 1998. Short note: Lack of nucleotide variability in a beetle pest with extreme inbreeding. *Insect Molecular Biology* 7: 197-200.
- Armendáriz-Toledano F, Niño A, Sullivan BT, Macías-Sámano J, Víctor J, Clarke SR, Zuñiga G. 2014. Two species within *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae): Evidence from morphological, karyological, molecular, and crossing studies. *Annals of the Entomological Society of America* 107: 11-27.
- Baker PS. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomologica Mexicana* 61: 9-24.
- Baker PS, Barrera JF. 1993. A field study of a population of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), in Chiapas, México. *Tropical Agriculture* 70: 351-355.
- Baker PS, Ley C, Balbuena R, Barrera JF. 1992. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* 82: 145-150.
- Baker PS, Rivas A, Balbuena R, Ley C, Barrera JF. 1994. Abiotic mortality factors of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71: 201-209.
- Barrera-Gaytan JF. 1994. Dynamique des populations du scolyte des fruits de cafeier, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), et lutte biologique avec le parasitoïde *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae), au Chiapas, Mexique. Tesis de doctorado. Université Paul-Sabatier, Toulouse III. Francia. 301 p.
- Barrera JF. 2012. Ficha técnica broca del café, *Hypothenemus hampei*. Senasica-Sagarpa-ECOSUR. 38 pp.

- Barrera JF, Herrera J, Valle J. 2005. Efecto de la altura de la trampa en la captura de la broca del café: implicaciones en dispersión y muestreo. *Entomología Mexicana* 4: 542-546.
- Barrera JF, Herrera J, Villacorta A, García H, Cruz-López L. 2006. Trampas de metanol-etanol para detección, monitoreo y control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. In Barrera, J.F. & Montoya, P. (Eds.) Simposio sobre trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. Pp. 71-83.
- Barrera JF, Herrera J, Chiu M, Gómez J, Valle-Mora J. 2008. La trampa de una ventana (ECOIPAR) captura más broca del café *Hypothenemus hampei* que la trampa de tres ventanas (ETOTRAP). *Entomología Mexicana* 7: 619-624.
- Barrera JF, Villacorta A, Herrera J. 2004. Fluctuación estacional de las capturas de La Broca del café (*Hypothenemus hampei*) con trampas de etanol-metanol e implicaciones sobre el número de trampas. *Entomologia Mexicana* 3: 540-544.
- Beille L. 1925. Les Stephanoderes sur les Caféiers cultivés a la Côte d'Ivoire. *Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale* 5:387-388.
- Benavides P, Vega FE, Romero-Severson J, Bustillo AE, Stuart JJ. 2005. Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Annals of Entomological Society of America* 98: 359-366.
- Bergamin J. 1943. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Ipidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 14: 31-72.
- Berthet JA. 1913. Caruncho do café. Informação prestada pelo Sr. Dr. Director do Instituto Agrônomo a respeito de amostras de café vindas do Congo Belga. *Boletim de Agricultura* 14 : 312-313.
- Bleiker KP, Heron RJ, Braithwaite EC, Smith GD. 2013. Preemergence mating in the mass-attacking bark beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae). *The Canadian Entomology*. 145: 12-19.
- Borbón-Martínez O, Mora Alfaro O, Cam Oehlschlager A, González LM. 2000. Proyecto de trampas, atrayentes y repelentes para el control de la broca del fruto de cafeto,

- Hypothenemus hampei* L. (Coleoptera: Scolytidae). Memoria, XIX Simposio Latinoamericano de Caficultura, San José, Costa Rica. Pp. 331-348.
- Brun LO, Stuart J, Gaudichon V, Aronstein K, French-Constant RH. 1995. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. Proceedings of the. National Academy of Sciences 92: 9861-9865.
- Campos-Almengor O. 1981. El gandul *Cajanus cajan* como hospedero de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) en Guatemala. In IV Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, Guatemala, Guatemala. Pp. 155-159.
- Castillo A, Espinoza JC, Valle-Mora J, Infante F. 2006. Dispersión del parasitoide africano *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) en un nuevo agroecosistema. Folia Entomologica Mexicana 45: 319-327.
- Constantino LM, Navarro L, Berrio A, Acevedo FE, Rubio D, Benavides P. 2011. Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionadae: Scolytinae). Revista Colombiana de Entomología 37: 173-182.
- Damon A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research 90: 453-465.
- Dixón AFG, Horth S, Kindlmann P. 1993. Migration in insects: Costs and strategies. Journal of Animal Ecology 62: 182-190.
- Douglas AE. 2013. Alimentary canal, digestión and absorption. In Simpson SJ, Douglas AE. Eds. The Insect Structure and function, 5th edition. Cambridge University Press. Pp. 46-80.
- Dow JAT. 2013. Excretion and salt and water regulation. In Simpson SJ, Douglas AE. Eds. The Insect Structure and function, 5th edition. Cambridge University Press. Pp. 546-587.
- Dufour BP, Barrera JF, Decazy B. 1999. La broca de los frutos del cafeto: ¿la lucha biológica como solución? In Bertrand B, Rapidel B. Eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica". IICA, San Jose, pp. 293-325.

- Dufour BP, González MO, Frérot B. 2000. Piégeage de masse du scolyte du café *Hypothenemus hampei* Ferr. (Col., Scolytidae) en conditions réelles: premiers résultats. In Proceedings of XVIII colloque international sur la science du café organized by the ASIC, Paris, Helsinki, Finlande, 2-8 août 1999, Paris, ASIC. pp. 480-491.
- Dufour BP, Franco Franco F, Hernández A. 2007. Evaluación del trampeo en el marco del manejo integrado de la broca del café. In: Barrera JF, García A, Domínguez V, Luna C. Eds. La Broca del Café en América Tropical: Hallazgos y Enfoques. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. México, p. 89-99.
- Dufour BP, Frérot B. 2008. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col. Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. Journal of Applied Entomology 132: 591-600.
- Fleatiaux E. 1901. Un ennemi du café du Ronilon (Congo). La Nature-Revue des sciences et de leur application à l'art et à l'industrie 29: 4.
- [FIRA] Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. 2016. Café 2016. Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial Pp. 37.
- Foster WA. 2005. Chapter 4: Behavior and Ecology. In Triplehorn CA, Johnson NF. Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects. p. 68.
- Gámez- Virués S, Jonsson M, Ekbom B. 2012. Chapter 7: The ecology and utility of local and landscape scale effects in pest management. In Gurr GM, Wratten SD, Snyder WE, Read DM. Eds. Biodiversity and Insect Pest: Key Issues for Sustainable Management. John Wiley & Sons Ltd. Pp.107-138.
- Gauthier N. 2010. Multiple cryptic genetic units in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae): evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. Biological Journal of the Linnean Society 101: 113-129.
- Gauthier N, Rasplus JY. 2014. Polymorphic microsatellite loci in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae). Molecular Ecology Notes 4:294-296.

- Giordanengo P. 1992. Biologie, eco-éthologie et dynamique des populations du Scolyte des grains de café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera, Scolytidae), en Nouvelle-Calédonie. Ph. D. thesis, Université de Rennes I, Rennes, France.
- Giordanengo P, Brun L, Frerot B. 1993. Evidence for allelochemical attraction of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, by coffee berries. *Journal of Chemical Ecology* 19: 763-769.
- Hagedorn M. 1910. Wieder ein neuer Kaffeeschädling. *Entomologische Blätter*. 6: 1-4.
- Hagler JR, Jackson CG. 2001. Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology* 46: 511-543.
- Hargreaves H. 1935. *Stephanoderes hampei* Ferr., Coffee Berry Borer in Uganda. *East African Agricultural Journal*, Novembre: 218-224.
- Hallberg E. 1983. The spermathecal complex in *Ips typographus* (L.): Differentiation of the spermathecal gland related to age and reproductive state. *Journal of Insect Physiology* 30: 197-202.
- Hoy MA. 2013. Chapter 13: Insect population ecology and molecular genetics. In Hoy MA. Ed. *Insect Molecular Genetics*, Third edition, pp. 591-659.
- [IOC] International Coffee Organization. 2015. Coffee Market Report, March 2015. 1-5 pp.
- Jaramillo, J., C. Borgemeister, and P. S. Baker. 2006a. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* 96: 223–233.
- Jaramillo J, Chabi-Olaye A, Borgemeister C. 2010. Temperature-dependent development and emergence pattern of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) from coffee berries. *Journal of Economic Entomology* 103: 1159-1165.
- Johnson CG. 1970. Migration and dispersal of insects by flight. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 96: 154-154.
- Kim KS, Shappington TW. 2013. Population genetics strategies to characterize long-distances dispersal of Insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 16: 87-97.
- Leefmans S. 1923. De Koffiebessenboeboek (*Stephanoderes hampei* Ferrari= *coffae* Hagedorn). I. Levenswijze en oecologie. *Mededeelingen van het Instituut voor Plantenzieken* 57: 1-93.

- Le Pelley RH. 1973. Las plagas del Café. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España.
- Leroy JV. 1936. Observation relatives à quelques insectes attaquant le caféier. Publications de l'institut national pour l'étude agronomique du Congo Belge, Série Scientifique 8:1-30
- Levins R, Wilson M. 1980. Ecological theory and pest management. Annual Review of Entomology 25: 287-308.
- López, A. 1993. Contribution à la biologie du scolyte du café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae). Mémoire de DEA, Université Paris XIII. France. 25 p.
- López-Guillén G, Valdez-Carrasco J, Cruz-López L, Barrera JF, Malo EA, Rojas JC. 2011. Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. Environmental Entomology 40: 441-448.
- Mansingh A. 1991. Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. Journal of Coffee Research 21: 67-98.
- Mathieu F, Brun LO, Frérot B. 1997. Factors related with native host abandonment by the coffee berry borer (Ferr.) (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomology 121: 175-180.
- Mathieu F, Brun LO, Frérot B, Suckling DM, Frampton C. 1999. Progression in field infestation is linked with tramping of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomology 123: 535-540
- Martay B, Robertshaw T, Doberski J, Thomas A. 2014. Does dispersal limit beetle re-colonization of restored Fenland? A cause study using direct measurements of dispersal and genetic analysis. Restoration Ecology 22: 590-597.
- Nathan R, Perry G, Cronin JT, Strand AE, Cain ML. 2003. Methods for estimating long-distance dispersal. Oikos 103: 261-273.
- Neiva A. 1928. Os trabalhos da Comissao de Estudo e Debellacao da Praga Cafeeira desde seu inicio. Comissão de Estudo e Debellacao da Praga Cafeeira. Pulicacao No 21. 27 pp.
- Neiva A, Da Costa Lima AM, De Andrade NA. 1924. Relatório sobre a praga do café. Lavoura (Brasil). 27: 135-238.

- Olivas A, Rivera C, Dufour B, Hidargo E, DeClerck F, Avelino J. 2010. Micro-Landscape context effects on the dispersal of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Costa Rica. International Conference on Coffee Science (ASIC), 03-08 march, 2010, Bali, Indonesia.
- Osborne JL, Loxdale HD, Woiwod IP. 2002. Chapter 2: Monitoring insect dispersal: methods and approaches. In Bullock JM, Kenward RE, Hails RS. Eds. Dispersal Ecology, Oxford UK. Pp. 24-49.
- Parra JRP. 2012. Chapter 3. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In Parra JRP. Ed. Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management. Pp. 51-92.
- Pascini TV, Ramalho-Ortigão M, Martins GF. 2012. Morphological and morphometrical assessment of spermatheca from virgin and inseminated *Aedes aegypti* females. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 107: 705-712.
- Pearson SM. 2002. Landscape Context. In Gergel SE, Turner MG. Eds. Learning Landscape Ecology. [online] Springer New York, pp.199–207. Available at: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-21613-8_14> [Accessed 6 May 2013].
- Pitnick S, Wolfner MF, Suarez SS. 2009. Ejaculate-female and sperm-female interactions. In Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S. Eds. Sperm biology: An evolutionary perspective. Academic Press. London. Pp. 247-304.
- Roepke W. 1919. Gegevens omtrent de Koffiebessen-boeboek (*Stephanoderis hampei* Ferrari= *coffae* Hgd.) Mededeelingen van het Instituut voor Plantenziekten 38: 1-32.
- Roff DA. 1986. The evolution of wing dimorphism in insect. Evolution. 40: 1009-1020.
- Rojas O. 1987. Zonificación agroecológica para el cultivo de café (*Coffea arabica*) en Costa Rica. Publicaciones Misceláneas (A1). San José, Costa Rica: IICA. Pp. 2-3.
- Rojo JE, Pérez-Urria CE. 2014. Café I (G. *Coffea*). Reduca 7:113-132.
- Rubio GJD, Bustillo PAE, Vallejo ELF, Acuña ZJR, Benavides MP. 2008. Alimentary canal and reproductive tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Neotropical Entomology 37: 143-151.

- Schowalter TD. 2006. Population ecology. In Showalter TD. Ed. Insect Ecology an ecosystem approach. Pp. 123-152.
- Silva WD, Mascarin GM, Romagnoli EM, Bento JMS. 2012. Mating behavior of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Journal of Insect Behavior 25:408-417.
- Silva WD, Moreira CC, Bento JMS. 2014. How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit? Journal of Insect Behavior 27: 729-735.
- Ticheler, J. 1961. Etude analytique de l'épidémiologie du scolyte des graines de café, *Stephanoderes hampei* Ferr, en Côte d'Ivoire. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen 61: 1-49.
- Topik, 2004. The world coffee market in the eighteenth an nineteenth centuries, from colonial to national regimes. In The first GEHN Conference, Bankside, London (17-20 th September 2003) funded by a Leverhulme Trust. pp. 34.
- [USDA, FAS] United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. 2016. Coffee World Markets and Trade. December, 2016.
- Vega EF, Infante F, Johnson AJ. 2015. The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer. In Vega FE, Hofstetter RW. Eds. Bark Beetles, Biology and Ecology of Native and Invasive Species, Oxford UK. Pp 427-494.
- Waterhouse DF, Norris KR. 1989. Biological Control Pacific Prospects-Supplement 1. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra, Australia.
- Whitehead MR, Peakal R. 2012. Microdot technology for individual marking of small arthropods. Agricultural and Forest Entomology 14: 171-175.
- Zolubas P, Byers JA. 1995. Recapture of dispersing bark beetle *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) in pheromone-baited traps: regression models. Journal of Applied Entomology 119: 285-289.